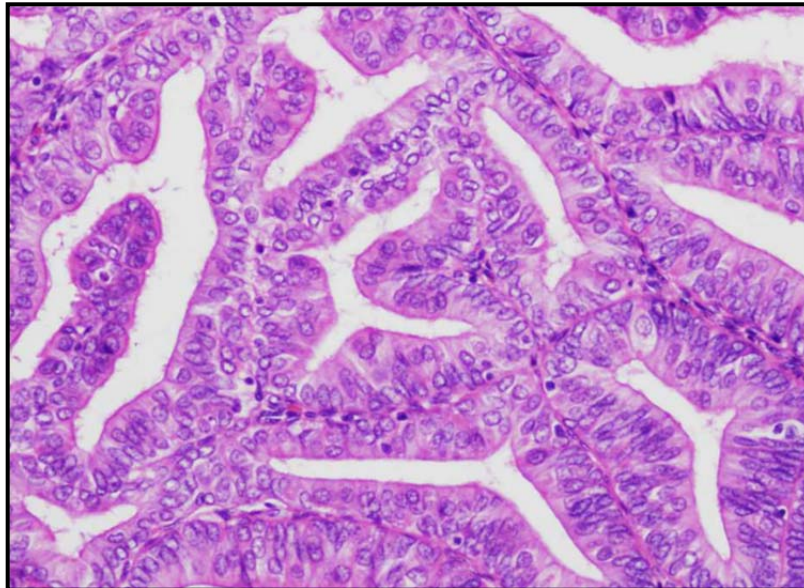




Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

TESIS DOCTORAL

Aplicabilidad de la RT-PCR a tiempo real a partir de tejido fijado en formol e incluido en parafina a la búsqueda de perfiles de expresión génica con valor pronóstico en cáncer de endometrio



MARIO PRIETO POZUELO

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la culminación de este proyecto:

A mi director de tesis, David Hardisson. Un gran patólogo y mentor, que además de enseñarme de manera altruista gran parte de los conocimientos de mi bella profesión durante la residencia, ha logrado inculcarme que la perseverancia es la clave del éxito. Sus sabios consejos y su rigurosidad han permitido que este trabajo haya podido llegar a buen fin.

A mi directora de tesis, Marta Mendiola, persona a la que tengo en gran estima y una gran admiración a nivel profesional. Su dedicación a la ciencia y sus amplios conocimientos, junto con su sencillez y carácter afable, le hacen digna de ser un modelo de referencia para cualquier científico.

A Fernando López-Ríos, por su ayuda incondicional. Por contagiarme su optimismo y sacar siempre lo mejor de mí. Una persona que ha velado siempre por mi progresión a nivel profesional como si fuera por su interés propio.

A Stefan por su colaboración en el análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo.

A todos los profesionales pertenecientes al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario la Paz que han colaborado en la realización en este proyecto. La recopilación del material, el trabajo de laboratorio y las horas delante del ordenador. No me cabe la menor duda que la realización de este trabajo ha sido posible gracias a su inestimable ayuda desinteresada.

A mis compañeros de trabajo, de los que he aprendido tanto. Siempre me han ofrecido su ayuda y consejo. Ellos hacen el día a día más llevadero con una simple sonrisa.

A mis amigos, que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han sabido darme ánimos en los momentos de flaqueza. Su presencia me hace sentir una persona muy afortunada. No hace falta que los nombre, ellos saben quiénes son y lo importantes que son para mí.

A aquellas personas que, aunque ya no están, están siempre presentes en mis recuerdos. Sé que les habría hecho mucha ilusión ver hasta dónde he llegado.

A mi hermano. Porque sé que puedo contar con él siempre que lo necesite.

Y finalmente, a las personas que más quiero: a mis padres. Por los valores que me han inculcado y porque el orgullo que sienten por mí es mi mayor felicidad. Las palabras nunca serán suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí y demostrarles cuánto les quiero.

RESUMEN

El cáncer de endometrio es el tumor maligno del tracto genital más frecuente en países desarrollados, y el segundo en mortalidad. En la mayoría de los casos se diagnostica en estadios iniciales y debuta como una neoplasia bien diferenciada, con una alta tasa de curación quirúrgica. Sin embargo, en aproximadamente el 20 % de los casos, se trata de un tumor de alto grado de comportamiento agresivo, que se presenta en estadios avanzados, con mayor tasa de recaída en el curso de la enfermedad.

El avance de las técnicas empleadas en la caracterización molecular en este tipo de neoplasias ha permitido una mayor comprensión del papel que juegan las distintas anomalías genéticas para poder aplicar estos conocimientos en la práctica clínica, con el objetivo de desarrollar un sistema de clasificación que integre las características histológicas y moleculares con un perfil pronóstico.

El desarrollo de perfiles de expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (TEM), la angiogénesis y el ciclo celular contribuiría a esclarecer el papel que desempeñan estos genes e identificar un conjunto de los mismos que permita diferenciar un grupo de pacientes que difieran en la tasa de supervivencia para realizar un adecuado manejo, así como identificar potenciales dianas terapéuticas.

El presente estudio se ha realizado en 46 carcinomas de endometrio de tipo endometrioides mediante análisis de RT-qPCR con tarjetas microfluídicas. Se ha analizado el efecto de las variables clínico-patológicas sobre la supervivencia de las pacientes, así como la expresión de genes relacionados con la TEM, la angiogénesis y el ciclo celular.

Nuestro análisis ha identificado el carácter pronóstico de los genes *EGFR*, *PLK1* y *PLK2*, así como dos perfiles, uno para supervivencia libre de enfermedad (SLE), compuesto por 3 genes, y otro para supervivencia global (SG), compuesto por 10.

Ambos modelos servirían para diferenciar a las pacientes de nuestra muestra en dos grupos de riesgo de manera significativa. No obstante, y debido al limitado tamaño muestral, los datos clínico-patológicos y genéticos incluidos para generar estos modelos predictivos podrían no ser representativos, por lo que sería imprescindible realizar una validación externa de los resultados mediante estudios prospectivos o validación *in silico*.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO	18
1.1.1. CARCINOMA ENDOMETRIOIDE	19
1.1.2. CARCINOMA MUCINOSO	20
1.1.3. CARCINOMA SEROSO	20
1.1.4. CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS	21
1.1.5. CARCINOMA INDIFERENCIADO	21
1.1.6. CARCINOMA DESDIFERENCIADO	22
1.1.7. CARCINOSARCOMAS	22
1.2. GRADO HISTOLÓGICO	23
1.3. ESTADIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE ENDOMETRIO: CLASIFICACIÓN DE LA FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA (FIGO)	25
1.4. FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	26
1.4.1. INVASIÓN DEL MIOMETRIO	26
1.4.2. INVASIÓN LINFOVASCULAR	26
1.4.3. AFECTACIÓN DEL CUELLO UTERINO (ESTADIO II)	27
1.4.4. AFECTACIÓN VAGINAL	27
1.4.5. INVASIÓN DE LA SEROSA Y/O AFECTACIÓN ANEXIAL	27
1.4.6. AFECTACIÓN DE LOS PARAMETRIOS	27
1.4.7. METÁSTASIS GANGLIONARES	27
1.5. PATOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO	28
1.5.1. <i>PTEN</i>	28
1.5.2. <i>PI3K</i>	28
1.5.3. <i>RAS-RAF-MEK-ERK</i>	29
1.5.4. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	30
1.5.5. β -CATENINA	30
1.5.6. E-CADHERINA	31
1.5.7. <i>TP53</i>	31
1.5.8. p16	31
1.5.9. <i>HER-2</i>	32
1.5.10. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CON <i>FGF</i>	32
1.5.11. GENES DE RECEPTORES HORMONALES	32
1.6. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM) Y ANGIOGÉNESIS	33
1.6.1. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA Y SU RELACIÓN CON EL CEE	33
1.6.2. IMPORTANCIA DE LA TEM EN EL CEE: MÁS ALLÁ DE LA INVASIÓN	35
1.6.3. RELACIÓN DEL PROCESO DE LA TEM CON LA ANGIOGÉNESIS	36

1.6.4. EL ESTADO TRANSITORIO DE LA TEM Y SU RELACIÓN CON LA PLURIPOTENCIALIDAD	38
1.7. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO: APORTACIONES DEL TCGA	38
1.7.1. SUBGRUPO ULTRAMUTADO O CON MUTACIÓN DE <i>POLE</i>	39
1.7.2. SUBGRUPO HIPERMUTADO O CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES	39
1.7.3. SUBGRUPO CON ESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y BAJO NÚMERO DE COPIAS	40
1.7.4. SUBGRUPO CON ALTO NÚMERO DE COPIAS (SEROSE-LIKE)	40
2. HIPÓTESIS	43
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAL Y MÉTODOS	47
4.1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	47
4.2. SELECCIÓN DE GENES	48
4.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	48
4.3.1. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL	49
4.3.2. SÍNTESIS DEL ADNc	49
4.3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	49
4.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
5. RESULTADOS	53
5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	53
5.2. RELACIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y LA SUPERVIVENCIA	54
5.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	56
5.4. GENERACIÓN DE UN MODELO DE SUPERVIVENCIA BASADO EN LAS VARIABLES GÉNICAS	56
6. DISCUSIÓN	61
6.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	61
6.1.1. VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	61
6.1.2. VARIABLES GÉNICAS	62
6.2. ASPECTOS METODOLÓGICOS	64
6.2.1. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN MEDIANTE RT-qPCR	64
6.2.2. ESTUDIO DE ARRAYS DE BAJA DENSIDAD CON SONDAS TAQMAN	67
6.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
6.3. BIOMARCADORES IDENTIFICADOS EN EL ANÁLISIS UNIVARIANTE	68
6.3.1. <i>EGFR</i>	68
6.3.2. PLK1 Y PLK2	69
6.4. PERFILES DE EXPRESIÓN CON VALOR PRONÓSTICO	71
6.4.1. ANÁLISIS Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADOS CON LA PROLIFERACIÓN Y EL CICLO CELULAR	73
6.4.2. ANÁLISIS Y PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA RELACIONADOS CON LA TEM	74
6.4.3. ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADOS CON ANGIOGÉNESIS	75
6.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	77
7. CONCLUSIONES	79

8. BIBLIOGRAFÍA	81
9. ANEXO	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Incidencia de tumores en mujeres España en el año 2012. Los datos de incidencia fueron proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN. Gráfico adaptado de «Las cifras del cáncer en España», 2016	177
Figura 2.	Imágenes de los principales tipos histológicos de CE	233
Figura 3.	Sistema de gradación histológica del CE	244
Figura 4.	Dibujo esquemático que incluye las vías de señalización del CE. Adaptado de Xianyong et al ¹⁰²	333
Figura 5.	La sobreexpresión de los reguladores de la TEM. Adaptado de Yibin et al ¹⁰⁶	345
Figura 6.	La TEM como un agente promotor de metástasis. Adaptado de Thiery et al. Cell 2009 ¹³⁷ .	377
Figura 7.	Esquema que representa la activación de la transición epitelio-mesénquima. Adaptado de Fabregat et al 2016 ¹⁴²	389
Figura 8.	Representación esquemática del análisis con sondas Taqman por RT-qPCR en tiempo real. Adaptado de Paik et al. ¹⁵⁵	50
Figura 9.	SLE y SG en relación al grado histológico (A, C) y estadio FIGO (B, D) (Kaplan-Meier)	555
Figura 10.	Curva ROC (arriba) y KM (abajo) para el modelo de predicción de SLE	588
Figura 11.	Curva ROC (arriba) y KM (abajo) para el modelo de predicción de SG	60
Figura 12.	Representación de factores y procesos que interrelacionan algunos de los genes analizados en nuestro trabajo. Adaptado de Calcagno et al ¹⁸³	644
Figura 13.	Pasos generales del proceso de análisis de expresión génica con tejido FFPE. Adaptado de Paik et al. ¹⁵⁵	666
Figura 14.	Estructura y patrones de expresión de las proteínas Plk. Adaptado de Yim et al ²²⁵	70
Figura 1 del anexo.	Diagrama de correlación entre las distintas variables génicas	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de la OMS 2014 de los carcinomas de endometrio	19
Tabla 2.	Estadificación del cáncer de endometrio (FIGO 2009)	25
Tabla 3.	Variables clínico-patológicas.	53
Tabla 4.	Análisis univariante de las variables clínico-patológicas con la supervivencia	55
Tabla 5.	Genes con significado pronóstico en supervivencia.	56
Tabla 6.	Modelo de SLE: genes seleccionados por las metodologías de <i>LASSO</i> y <i>boosting</i>	56
Tabla 7.	Genes seleccionados para el modelo de SLE	57
Tabla 8.	Valores de R (AUC) y p-valor de las curvas ROC para SLE	58
Tabla 9.	Genes seleccionados para el modelo de SG	59
Tabla 10.	Valores de R (AUC) y p-valor de las curvas ROC para SG	59
Tabla 1 del anexo.	Genes descritos implicados en el desarrollo del CE.	107
Tabla 2 del anexo.	Valores de expresión de los 76 genes obtenidos mediante el análisis de las tarjetas TLDA	109
Tabla 3 del anexo.	Análisis univariante de los genes para SLE	111
Tabla 4 del anexo.	Análisis univariante de los genes para SG	112

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de endometrio (CE) es el tumor maligno del tracto genital más frecuente en España, y el segundo en mortalidad, tras el cáncer de ovario¹. A nivel mundial, es el sexto cáncer más común en mujeres²; en España constituye el tumor más frecuente en mujeres, después del cáncer de mama, pulmón y colon (Figura 1). En el año 2015 presentó una incidencia de 5,9 por cada 100.000 mujeres y una tasa de mortalidad de 3,1 por 100.000².

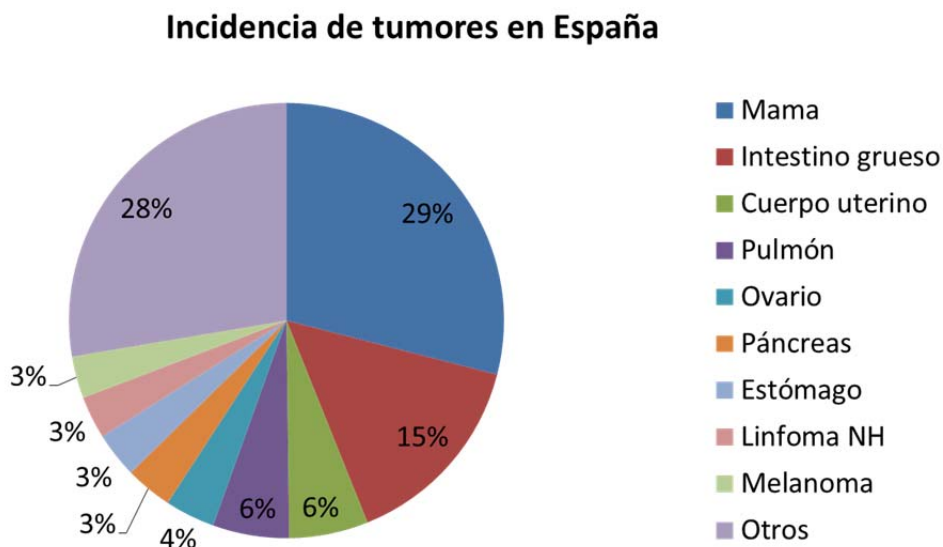


Figura 1. Incidencia de tumores en mujeres España en el año 2012. Los datos de incidencia fueron proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN. Gráfico adaptado de «Las cifras del cáncer en España», 2016

En la mayoría de los casos, el CE debuta como una neoplasia bien diferenciada y confinada al útero (estadio temprano), con una alta probabilidad de curación. Sin embargo, en aproximadamente el 20 % de los casos, se trata de un tumor de alto grado y de comportamiento agresivo, con invasión miometrial profunda y presencia de invasión linfocascular.

Desde hace varias décadas se viene manejando un modelo dualístico para clasificar el CE elaborado por Bokhman³, en función de sus características clínicas, metabólicas y epidemiológicas. Los tumores de tipo I son tumores estrógeno-dependientes, que con frecuencia ocurren en mujeres con sobrepeso en la perimenopausia. Éstos se desarrollan a partir de una lesión precursora, denominada hiperplasia endometrial, y suelen corresponderse con carcinomas endometrioides (CEE) bien diferenciados, que expresan receptores hormonales. Al ser diagnosticados en estadios precoces, suelen cursar con buen pronóstico. Por otro lado, los tumores de tipo II se dan en mujeres postmenopáusicas, sin relación con los niveles de estrógenos para su desarrollo, y debutan sobre un endometrio atrófico, o bien sobre una lesión precursora, denominada carcinoma intraepitelial. Estos

tumores son típicamente de tipo seroso, pobremente diferenciados, no expresan receptores hormonales y se asocian a un peor pronóstico, incluso en estadios precoces⁴.

Sin embargo, existen tumores que son difíciles de clasificar histológicamente debido a la superposición de sus características, incluso cuando el diagnóstico es llevado a cabo por patólogos expertos. Así, entre el 10-19 % de los CEE son de alto grado⁵ y tienen características morfológicas, clínicas y moleculares que son, o bien intermedias entre las de los tipos I y II, o se asemejan más a las de tipo II, incluyendo la falta de asociación con hiperplasia endometrial y un curso agresivo⁶. Por otro lado, no todos los carcinomas serosos parecen comportarse siguiendo el prototipo II de este modelo dualístico. De hecho, el 2 % de los carcinomas serosos se desarrollan en un contexto de hiperplasia endometrial, y hasta en un 20 % no presentan infiltración profunda del miometrio⁷. Además, algunos CE de alto grado, tales como los carcinosarcomas, los carcinomas de células claras o los carcinomas indiferenciados, no han sido tenidos en cuenta en la clasificación original y no parecen acoplarse con facilidad a los criterios de este modelo dualístico⁸.

Los resultados de los estudios genéticos y de secuenciación masiva han ampliado sustancialmente el conocimiento de las características moleculares del CE. No obstante, es necesaria una mayor comprensión del papel que juegan las distintas alteraciones moleculares para poder aplicar clínicamente estos conocimientos a las pacientes. La mejora y evolución en las distintas tecnologías de perfiles de expresión génicos y proteómicos pueden proporcionar las bases para el desarrollo de un sistema de clasificación que integre las características histológicas y moleculares del CE.

1.1. Clasificación histológica del carcinoma de endometrio

La actual clasificación histológica de la OMS reconoce distintos tipos de carcinomas. La mayoría de los adenocarcinomas endometriales tienen la morfología "típica" o "NOS» (*Not Otherwise Specified*), que suele hacer referencia al subtipo de carcinoma endometriode. Más de la mitad de todos los CE tienen este patrón. Los otros tipos histológicos de CE son relativamente poco frecuentes. Los subtipos serosos y los tumores mucinosos representan el 10-15 % de los tumores primarios de endometrio, y el adenocarcinoma de células claras no supera el 5 % del total de casos.

Tabla 1. Clasificación de la OMS 2014 de los carcinomas de endometrio

Adenocarcinoma endometrioide <ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma endometrioide, con diferenciación escamosa • Adenocarcinoma endometrioide, con diferenciación secretora • Adenocarcinoma endometrioide, variante villoglandular
Adenocarcinoma mucinoso
Carcinoma intraepitelial seroso de endometrio
Carcinoma seroso
Carcinoma de células claras
Tumores neuroendocrinos <ul style="list-style-type: none"> • Tumor neuroendocrino de bajo grado <ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinoide • Tumor neuroendocrino de alto grado <ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas ○ Carcinoma neuroendocrino de célula grande
Carcinoma mixto
Carcinoma indiferenciado
Carcinoma desdiferenciado

Los tipos histológicos más significativos del CE se representan en la figura 2, al final de este apartado.

1.1.1. Carcinoma endometrioide

El carcinoma endometrioide de endometrio muestra típicamente un patrón de crecimiento glandular, con formación de estructuras cribiformes o de patrón papilar. Las células que tapizan las glándulas recuerdan al endometrio en fase proliferativa, con distintos grados de atipia nuclear.

a. Carcinoma endometrioide con diferenciación escamosa

El fenómeno de diferenciación escamosa ocurre en el 20-30 % de los CEE. En este subtipo se reconocen perlas córneas y células de citoplasma abundante y poligonal, con puentes intercelulares prominentes. Varios estudios han demostrado que los CEE, con o sin diferenciación escamosa, se comportan según el grado de diferenciación glandular⁹. Por ello, los tumores deben ser clasificados como grado 1, 2 ó 3 en función de sus características arquitecturales y nucleares del componente glandular¹⁰.

En general, los CEE expresan pancitoqueratinas, CK7, EMA, Ber-EP4 y vimentina, mientras que son negativos para CK20 y CEA¹¹.

b. Carcinoma endometrioide con diferenciación secretora

Menos del 2 % de los CEE están compuestos por células columnares que exhiben vacuolas sub o supranucleares de glucógeno, similares al endometrio secretor del ciclo. Este subtipo suele corresponderse con tumores bien diferenciados y se da con mayor frecuencia en mujeres postmenopáusicas¹².

c. Carcinoma endometrioide, variante villoglandular

En esta variante las células se disponen en una arquitectura papilar, con ejes fibrovasculares finos, revestidos por células epiteliales que muestran escasa atipia citológica. Esta variante suele asociarse a un comportamiento poco agresivo, con escasa invasión del miometrio¹³.

1.1.2. Carcinoma mucinoso

El carcinoma mucinoso (CM) tiene una arquitectura glandular parecida al CEE, pero se compone de células que contienen abundante mucina intracitoplasmática en más del 50 % de las células. El uso de tinciones especiales para mucina, como el mucicarmín o PAS pueden ser útiles para demostrar la presencia de mucina. Hasta un 9 % de todos los carcinomas endometriales en estadio I son de tipo mucinoso¹⁴. Los CM suelen ser bien o moderadamente diferenciados, y con frecuencia exhiben una arquitectura papilar.

El diagnóstico diferencial más importante del CM es con el adenocarcinoma de origen endocervical, sobre todo en tumores que asientan en el segmento uterino bajo o que afectan al istmo. El principal objetivo de realizar un estudio de inmunohistoquímica en este subtipo es diferenciarlo frente a dicho origen. Generalmente, los CM expresan de forma difusa vimentina, ER y PR, pero no expresan CEA. El perfil contrario se expresa en los de origen endocervical¹⁵.

1.1.3. Carcinoma seroso

El carcinoma seroso (CS) se caracteriza por una arquitectura papilar, revestida por células con marcada atipia nuclear, como la variante ovárica. Dichas papilas son toscas y groseras, con ejes fibrosos tapizados por células pleomórficas, con núcleos hipercromáticos y con presencia de macronúcleos.

En ocasiones, el tumor puede estar compuesto mayoritariamente por glándulas con luces relativamente bien definidas, sobre todo en el componente infiltrante mioinvasivo. Los bordes de las luces de estas glándulas son ondulados, a diferencia de los contornos lineares y lisos que muestran las glándulas del subtipo endometrioide¹⁶.

Pueden llegar a observarse cuerpos de psammoma hasta en un tercio de los casos¹⁷. Estos tumores a menudo infiltran extensamente el miometrio y suelen acompañarse de invasión linfovascular.

La mejor prueba distintiva para diferenciar el CS del CEE es la tinción inmunohistoquímica frente a p53. Los CS muestran inmunorreactividad intensa y difusa frente a p53. La expresión proteica suele estar asociada normalmente con mutaciones del gen *TP53*¹⁸, aunque en algunos casos la expresión proteica es completamente negativa debido a una mutación truncada. Por tanto, la expresión de p53 en los carcinomas de tipo seroso ha sido definida como un patrón de "todo o nada"^{19,20}.

La inmunotinción frente a p16 también puede ser útil para distinguir los CS de los CEE. La tinción ha de ser fuerte y difusa en los primeros, mientras que los CEE muestran una tinción irregular, parcheada y débil²¹. p16 se expresa en aproximadamente el 90 % de los carcinomas serosos uterinos puros, pero también en un tercio de los CEE de grado 3 y en algunos carcinomas de células claras²².

Los CS no suelen expresar receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), a diferencia de los CEE.

1.1.4. Carcinoma de células claras

En el carcinoma de células claras (CCC), la mayoría de las células tienen un citoplasma poligonal, claro y vacuolado debido a la presencia de glucógeno citoplasmático. También existe otra variante oxífila, que se caracteriza por exhibir un citoplasma eosinófilo y granular¹⁶. Los núcleos son marcadamente pleomórficos, con presencia de macronúcleolos y mitosis atípicas.

Este tumor puede tener una gran variedad de patrones de crecimiento, incluyendo tubular, quístico, papilar y sólido. El estroma es bastante característico, mostrando zonas hialinizadas y otras de aspecto mixoide.

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, los CCC muestran positividad frente a CK7, EMA, CA125, Ber-EP4 y CEA. Sin embargo, los CCC tienen una expresión nula o débil frente a receptores hormonales. La tinción de p16 es positiva hasta en el 50 % de los casos. La tasa de expresión de p53 es baja en comparación con el CS^{23,24}.

1.1.5. Carcinoma indiferenciado

El carcinoma indiferenciado (CI) es un tumor raro (representa menos del 2 % de los CE) y de comportamiento muy agresivo. Este subtipo no muestra evidencia de diferenciación glandular o escamosa, y puede presentar características similares al carcinoma de células pequeñas del pulmón, incluyendo diferenciación neuroendocrina focal.

Las células a menudo tienen un patrón de crecimiento sólido, con extensas áreas de necrosis. Las células neoplásicas son discohesivas, tienen escaso citoplasma y núcleos hipercromáticos con nucléolo. La mayoría de los casos muestran una alta tasa mitótica, con más de 25 mitosis/10 CGA. Un dato llamativo es la presencia de un elevado número de linfocitos intraepiteliales.

El CI muestra diferenciación epitelial de forma focal (menos del 10 % de las células), con expresión de EMA y CK18, sin expresión significativa de citoqueratinas de amplio espectro. No expresan inmunotinción frente a receptores hormonales (RE y RP). Aproximadamente la mitad de estos tumores presentan inestabilidad de microsatélites, con hipermetilación del promotor de *MLH1* y pérdida de la expresión proteica de MLH1 y PMS2²⁵.

1.1.6. Carcinoma desdiferenciado

Aproximadamente un 40 % de los carcinomas indiferenciados se asocian a un segundo componente bien o moderadamente diferenciado²⁶. En estos casos, el componente diferenciado suele revestir la superficie del tumor, mientras que el componente indiferenciado se localiza en profundidad.

1.1.7. Carcinosarcomas

Los carcinosarcomas son neoplasias infrecuentes, pero de curso agresivo, que se caracterizan por estar constituidas por un doble componente, epitelial y mesenquimal, ambos malignos.

Los carcinosarcomas endometriales, también conocidos como tumores müllerianos mixtos malignos, representan aproximadamente el 2-5 % de las neoplasias malignas del cuerpo uterino. Aunque estos tumores fueron originalmente clasificados como sarcomas uterinos, varios estudios inmunohistoquímicos y moleculares han demostrado una histogénesis común con los CE, apoyando la hipótesis de que los carcinosarcomas representan carcinomas de tipo metaplásico²⁷.

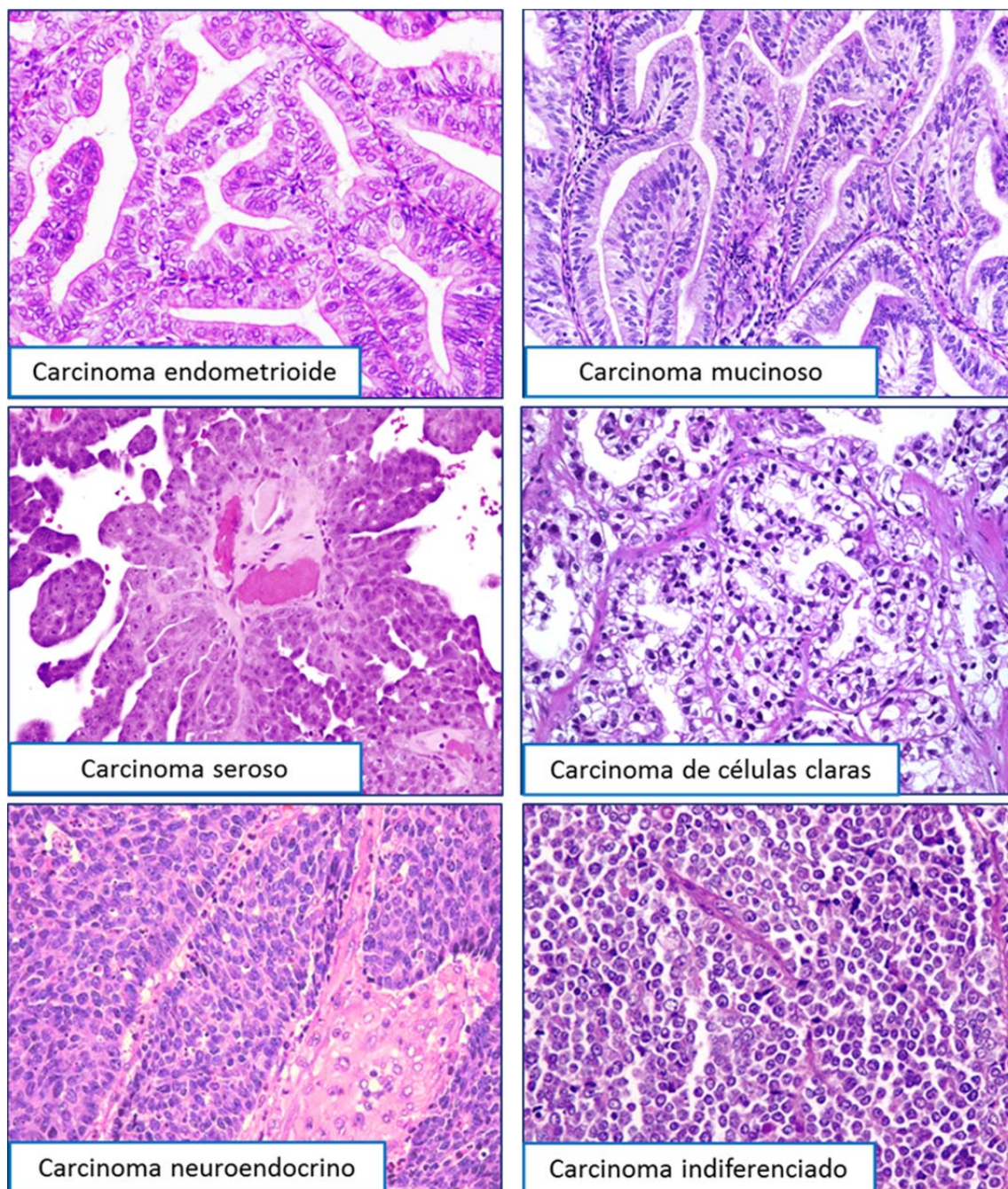


Figura 2. Imágenes de los principales tipos histológicos de CE

1.2. Grado histológico

Mientras que los carcinomas de endometrio no endometrioides (CENE) se consideran tumores de alto grado por definición y, por tanto, no necesitan ser graduados, la clasificación de los CEE es importante para el pronóstico, ya que estos tumores abarcan un amplio espectro de lesiones, que comprende desde neoplasias muy bien diferenciadas hasta tumores completamente indiferenciados²⁸.

El valor pronóstico de la clasificación de los CE ha sido reconocido desde hace muchos años. El sistema de clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y

Obstetricia (FIGO) de 1988 se basa en sus características arquitecturales²⁹. Los tumores que tienen un componente sólido menor al 5 % son de grado 1; del 6 % al 50 % son de grado 2 y los que presentan una morfología sólida superior al 50 % son de grado 3, teniendo en cuenta que las áreas de diferenciación escamosa no se incluyen en este cómputo³⁰(Figura 3).

Una modificación secundaria, que conlleva un aumento del grado, se realiza en casos de tumores de grado 1 o 2 en presencia de atipia nuclear notable, inadecuada para el grado arquitectural, ya que en la mayoría de estos casos se ha visto una asociación con tasas de supervivencia disminuidas³¹.

Como ya se ha comentado, el grado histológico se correlaciona con el pronóstico de las pacientes con CEE. Así, las cifras de supervivencia global a los 5 años para las mujeres con CEE en estadio I y grado 1 fueron del 92 %, 88 % para el grado 2 y 75 % para el grado 3³². El grado también es un marcador significativo en mujeres con estadio III de la enfermedad, con tasas de supervivencia del 70 %, 63 % y 40 % para los grados 1, 2 y 3, respectivamente.

Sin embargo, debido a que el grado histológico se correlaciona con otra serie de factores pronósticos, como la edad, el estadio y la profundidad de invasión del miometrio, el grado histológico no está considerado un marcador pronóstico independiente. De hecho, su importancia disminuye después del ajuste por estos otros factores³³. No obstante, como se sugiere en varios estudios³⁴, incluso en pacientes con enfermedad en estadio avanzado, el grado histológico tiene cierto valor pronóstico.

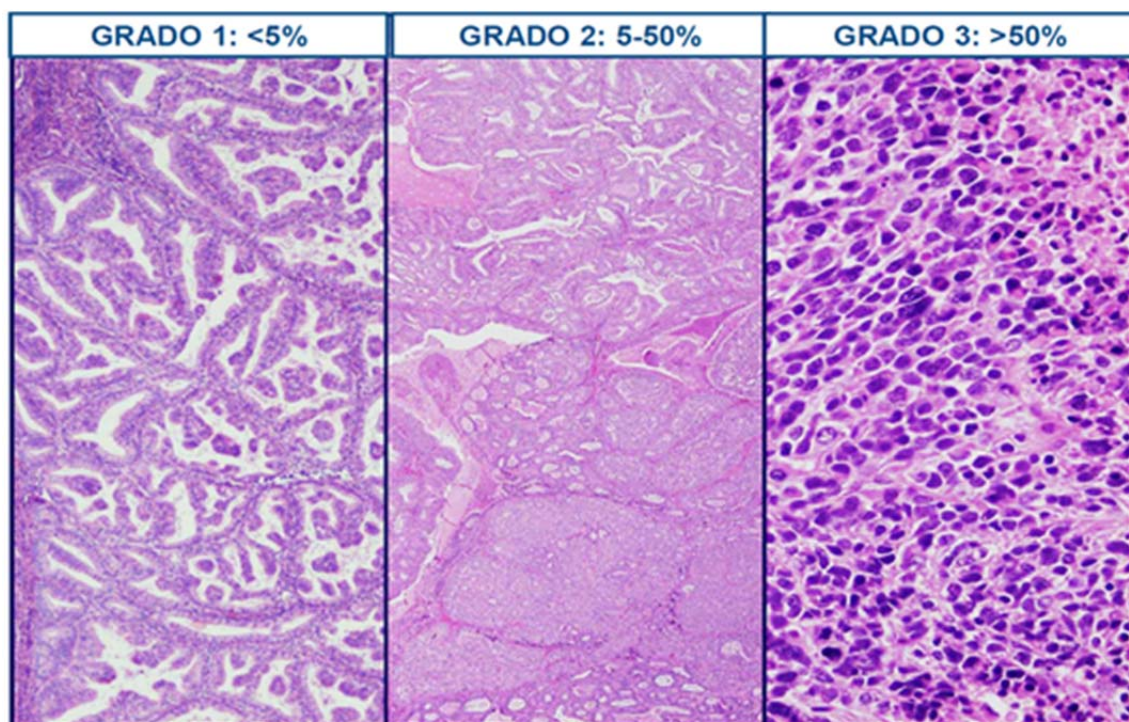


Figura 3. Sistema de gradación histológica del CE

1.3. Estadificación del carcinoma de endometrio: clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO)

Aunque no es perfecto, el sistema de estadificación propuesto por la FIGO es el factor pronóstico más importante del carcinoma de endometrio^{35,36}.

Este sistema requiere la evaluación en la pieza de histerectomía, así como la evaluación de los ganglios linfáticos pélvicos y paraórticos, los anejos y la citología del líquido peritoneal³⁷. Este sistema fue revisado en 2009 para mejorar aún más el valor pronóstico de la estadificación quirúrgica, dividiendo a los CE en 4 estadios: (I) tumores confinados en el cuerpo uterino; (II) afectación del cuello uterino; (III) afectación de órganos pélvicos; y (IV) extensión más allá de la pelvis³⁸ (Tabla 2).

Tabla 2. Estadificación del cáncer de endometrio (FIGO 2009)

Estadio I	Tumor confinado al cuerpo del útero
IA	No invasión del miometrio o inferior a la mitad
IB	Invasión del miometrio igual o superior a la mitad
Estadio II	Tumor invade el estroma cervical
Estadio III	Extensión local y/o regional
IIIA	Tumor invade la serosa del cuerpo uterino
IIIB	Afectación vaginal y/o parametrial
IIIC	Metástasis a ganglio pélvicos y/o paraórticos
IIIC1	Ganglios pélvicos positivos
IIIC2	Ganglios paraórticos positivos
Estadio IV	Tumor que invade la mucosa de vejiga/recto o con metástasis
IVA	Tumor que invade la mucosa vesical o rectal
IVB	Metástasis a distancia (intraabdominales y/o inguinales)

Los principales cambios del sistema FIGO 2009 incluyen:

1. Los tumores intramucosos (1988 IA) y los tumores con <50 % de invasión del miometrio (1988 IB) se combinan (2009 IA).
2. La participación glandular cervical no afecta la estadificación (1988 IIA cambió a 2009 IA-IB).
3. La citología peritoneal no afecta la estadificación (1988 IIIA con citología positiva cambió a 2009 IA-II).
4. Los tumores con metástasis en los ganglios linfáticos (1988 IIIC) se subdividen a las etapas IIIC1 (ganglios pélvicos positivos) y IIIC2 (ganglios para-aórticos positivos con o sin ganglios pélvicos positivos).

La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años se ha reportado en un 90 % para el estadio I, el 83 % para el estadio II, y el 43 % para el estadio III³⁹.

1.4. Factores pronósticos clínico-patológicos

1.4.1. Invasión del miometrio

La invasión del miometrio es reconocible cuando se observan glándulas irregulares rodeadas por un estroma desmoplásico. El patrón de invasión del miometrio puede variar considerablemente, con glándulas o nidos sólidos dispersos, a menudo asociados con retracción del estroma.

El grado de invasión miometrial es un factor de riesgo importante para la presencia de metástasis en ganglios linfáticos y, en algunos estudios, incluso supervivencia. En un estudio realizado por el *Gynecologic Oncology Group (GOG)*⁴⁰, se encontró que la profundidad de la invasión miometrial estaba relacionada con la presencia de enfermedad extrauterina, incluyendo metástasis de ganglios linfáticos pélvicos.

La decisión de realizar linfadenectomía pélvica y/o paraaórtica se basa en gran medida en la afectación de invasión miometrial (así como del subtipo y grado histológico). De forma intraoperatoria, el patólogo puede ser requerido para evaluar estas características en cortes en congelación⁴¹. En tumores confinados al endometrio, el riesgo de metástasis ganglionar es insignificante; en tumores con invasión superficial, el riesgo es importante sólo para los carcinomas de alto grado; cuando la invasión del miometrio es profunda, todos los grados tumorales tienen un riesgo sustancial (20 a 45 %)⁴².

1.4.2. Invasión linfovascular

La presencia de células tumorales dentro de espacios linfovasculares es un factor predictor importante de recidiva y de muerte por enfermedad, independientemente del grado histológico o la profundidad de invasión del miometrio⁴³. La invasión vascular sanguínea parece ser más importante que la de vasos linfáticos, aunque generalmente no se especifique esta diferencia de forma rutinaria en los informes anatomopatológicos⁴⁴.

La retracción del estroma es un artefacto frecuente que puede simular invasión vascular. La tinción de células endoteliales con técnicas de inmunohistoquímica con factor VIII o CD31 puede facilitar su reconocimiento⁴⁵. La invasión vascular es poco frecuente en CEE. La frecuencia de invasión vascular es más frecuente en los tipos histológicos desfavorables, de alto grado, y con invasión profunda del miometrio. Sin embargo, la presencia de invasión vascular, independiente del grado y de la profundidad de invasión muscular, es altamente sugestiva de metástasis en ganglios linfáticos⁴³. La invasión vascular se produce en torno a un 35-95 % de carcinomas de tipo seroso⁴⁶.

1.4.3. Afectación del cuello uterino (estadio II)

La afectación cervical en el CE puede estar presente en el 6-20 % de los casos. Por lo general resulta de la extensión directa, aunque también puede ser secundaria a la implantación a través de vasos linfáticos^{47,48}. Los tumores que afectan al cuello del útero tienen peor pronóstico que los que están confinados al cuerpo uterino, con tasas de supervivencia a los 5 años del 75 % en pacientes con afectación cervical respecto al 88 % para neoplasias en estadio I³².

1.4.4 Afectación vaginal

La recidiva del CE es relativamente común en la vagina, pero las metástasis en la vagina se producen en menos del 1 % de las mujeres en el momento del diagnóstico inicial. La supervivencia a 5 años para las mujeres con metástasis vaginal aislada es de alrededor del 25 % y la supervivencia media es inferior a 2 años⁴⁹.

1.4.5 Invasión de la serosa y/o afectación anexial

En opinión de muchos oncólogos ginecológicos, los criterios utilizados para la clasificación del CE en estadio III (6 % de los casos) son artificiales⁵⁰.

El significado pronóstico adverso de tumores en estadio IIIA en base a la afectación de la serosa por parte del tumor representa el extremo de la invasión miometrial profunda (estadio IB). Según algunos autores, la afectación serosa conlleva un curso clínico distinto de la extensión a los anejos, por lo que ambos hechos no deberían ser agrupados como equivalentes en el mismo estadio.

La supervivencia libre de enfermedad a 5 años en mujeres con afectación anexial es del 37 %⁵¹ y ha sido identificada como un factor pronóstico adverso independiente de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global⁵².

1.4.6 Afectación de los parametrios

Los CE que asientan en el segmento uterino bajo, o aquellos con afectación cervical, pueden invadir los tejidos parametriales por extensión directa o invasión linfovascular. La afectación parametrial en el CE se produce en el 6-13 %⁵³. Se han demostrado correlaciones significativas de la afectación de los parametrios con el estadio, la profundidad de invasión miometrial y cervical, la invasión linfovascular, y las metástasis a ganglios linfáticos pélvicos. Su afectación confiere, por tanto, un pronóstico adverso y se considera un factor independiente de mal pronóstico.

1.4.7 Metástasis ganglionares

Los CE asociados con metástasis ganglionares se engloban en el estadio IIIC. Casi el 33 % de las pacientes con ganglios linfáticos pélvicos positivos tienen también ganglios

paraaórticos positivos. La afectación de los ganglios pélvicos es más favorable que la de los paraaórticos⁵⁴.

En el estadio I, la frecuencia de metástasis de los ganglios linfáticos se relaciona con la profundidad de invasión miometrial. La invasión del tercio interno, medio y externo del miometrio se asocia con una tasa de metástasis en los ganglios linfáticos del 5, 23 y 33 % respectivamente⁵⁵.

1.5. Patología molecular del cáncer de endometrio

1.5.1. *PTEN*

El gen más frecuentemente alterado en el CEE es *PTEN*. *PTEN* se comporta como un gen supresor de tumores, y se encuentra en el cromosoma 10q23.3.

La disminución de la actividad de *PTEN* causa un aumento de la proliferación y supervivencia celular a través de la modulación de la transducción de vías de señalización. El gen *PTEN* puede ser inactivado por varios mecanismos, tales como mutación, pérdida de heterocigosidad (LOH) e hipermetilación del promotor.

Las mutaciones somáticas de *PTEN* son comunes en el CEE, produciéndose hasta en un 83 % de los casos⁵⁶; las mutaciones germinales de *PTEN* son responsables del síndrome de Cowden⁵⁷. *PTEN* puede ser también inactivado por delección, como se observa en la LOH en el 40 % de los CE⁵⁸. La hipermetilación del promotor que conduce a la inactivación de *PTEN* se produce en aproximadamente el 20 % de los tumores, la mayoría de los cuales se encuentran en estadios avanzados⁵⁹.

Las mutaciones de *PTEN* se observan en el 60–86 % de los CEE que presentan inestabilidad de microsatélites, y en el 24–35 % de los tumores sin inestabilidad. Las mutaciones de *PTEN* se consideran un evento temprano en la patogénesis del CEE y de lesiones precursoras, y pueden preceder incluso al desarrollo de inestabilidad de microsatélites⁶⁰. Aunque los hallazgos sobre la importancia pronóstica de las mutaciones de *PTEN* en el CE son controvertidos, algunos datos sugieren que *PTEN* se asocia con una edad menor al diagnóstico, un estadio no avanzado, una histología endometriode, bajo grado histológico y un pronóstico favorable (78 % supervivencia a los 5 años para los pacientes sin mutaciones, en comparación con 95 % y 93 % para los pacientes con una o más mutaciones, respectivamente)⁶¹.

1.5.2. *PI3K*

PI3K (quinasa fosfatidil inositol 3) es una enzima heterodimérica que consta de una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). El gen *PIK3CA*, localizado en el cromosoma 3q26.32, codifica la subunidad catalítica, (p110 α) de *PI3K*, mientras que *PIK3R1* codifica la subunidad p85⁶².

Las mutaciones en *PIK3CA* contribuyen a la alteración de la vía de señalización de *PI3K-AKT* en los CE en el 24-39 % de los casos⁶³, y pueden coexistir además con mutaciones de *PTEN* (15-27 %) y mutaciones de *KRAS*⁶⁴. Estos hallazgos sugieren que las mutaciones de *PIK3CA* podrían cooperar con estas alteraciones en la transformación maligna del endometrio⁶⁵.

La activación de *PI3K* produce un segundo mensajero, PIP3, que posteriormente activa diversas vías, como *AKT*. Esta regulación implica la supresión de la apoptosis e incrementa la proliferación celular.

Los tumores con mutaciones del exón 9 de *PIK3CA* son más propensos a ser carcinomas de bajo grado; por el contrario, los carcinomas con mutaciones en el exón 20 o con sobreexpresión de RNAm de *PIK3CA* suelen ser carcinomas de alto grado, asociados a la invasión miometrial y linfovascular⁶⁶. Los tumores con activación de *AKT*, por mutación de *PIK3CA* o *PTEN*, suelen asociarse con un pronóstico favorable⁶⁷.

1.5.3. RAS-RAF-MEK-ERK

KRAS codifica una proteína de la familia de las GTPasas y está implicada en la vía de transducción de señales entre los receptores de la superficie celular y el núcleo, con un papel importante en la tumorigénesis. Las mutaciones de *KRAS* se han identificado en el 10-30 % de los CEE, mientras que están prácticamente ausentes en CS y CCC⁶⁸.

Algunos estudios han encontrado una mayor frecuencia de mutaciones de *KRAS* en carcinomas con inestabilidad de microsatélites^{65,69}, lo que sugiere que ambos eventos podrían ocurrir de forma simultánea antes del proceso de expansión clonal⁷⁰.

Se han identificado mutaciones de *KRAS* en hiperplasias de endometrio con una tasa similar a la observada en CEE, lo que sugiere que las mutaciones *KRAS* son eventos tempranos en la carcinogénesis endometrial⁷¹.

No se han encontrado asociaciones significativas entre las mutaciones *KRAS* y el estadio tumoral, el grado histológico, la profundidad de invasión del miometrio, la edad o el curso clínico en el CEE⁷².

Los efectores de *RAS*, tales como RASSF1A, proporcionan una señal inhibitoria del crecimiento, que necesita ser inactivada durante el proceso de tumorigénesis. La inactivación de RASSF1A por la hipermetilación del promotor puede contribuir significativamente al aumento de la actividad de la vía de señalización *RAS-RAF-MEK-ERK*⁷³.

BRAF, otro miembro de la vía *RAS-RAF-MEK-ERK*, está mutado con muy poca frecuencia en los CE⁷⁴.

1.5.4. Inestabilidad de microsatélites

Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN que son propensas a sufrir errores durante el proceso de replicación. Normalmente, estos errores son corregidos por los genes reparadores del ADN. Las mutaciones en estos genes dan lugar a la inestabilidad de microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés), con su consecuente pérdida de función. La acumulación progresiva de alteraciones en los microsatélites promueve la carcinogénesis y tiene un papel importante en el CE⁷⁵.

La MSI se observa en cánceres (colon y endometrio principalmente) de pacientes con síndrome de Lynch, pero también se produce en el 25-30 % de los CE esporádicos⁷⁶, que suelen ser de tipo endometriode, especialmente los de alto grado (grados 2 y 3⁷⁷), y rara vez en tumores de tipo II⁷⁸.

Los pacientes con síndrome de Lynch tienen una mutación en línea germinal en *MLH-1*, *MSH-2*, *MSH-6* o más rara vez, *PMS-2*. Por otro lado, en el CE esporádico, la inactivación de *MLH-1* por la hipermetilación del promotor es la principal causa de MSI, y ocurre como un evento temprano en la patogénesis del CE⁷⁹. Por tanto, la MSI se produce como resultado de alteraciones genéticas (por mutación de los genes MMR) o epigenéticas (por metilación del promotor de *MLH1*⁸⁰, mediante silenciamiento transcripcional).

1.5.5. β -CATENINA

El gen de la β -catenina (*CTNNB1*) se localiza en el cromosoma 3p21. *CTNNB1* parece tener un papel importante en procesos relacionados con la vía *APC* (poliposis adenomatosa coli) y la E-cadherina⁸¹. *CTNNB1* forma parte del complejo E-cadherina-catenina, que es esencial para la diferenciación celular y el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal. También juega un papel importante en la vía *Wnt* de transducción de señales⁸².

Las mutaciones activadoras en el exón 3 de *CTNNB1* se observan entre el 25- 38 % de los CE de tipo I⁸³. Estas mutaciones dan lugar a la estabilización de la proteína β -catenina, a su acumulación nuclear y citoplasmática y a la participación en la activación transcripcional a través de la formación de complejos con proteínas de unión a ADN o con factores como LEF1 (factor 1 potenciador linfoide) y TCF (factor de células T), activando a su vez la transcripción de otros genes, tales como *MYC* y *ciclina D1*^{84,85}. La proteína APC disminuye los niveles de β -catenina, cooperando con la acción de la quinas glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β), induciendo la fosforilación de residuos de serina-treonina y su degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma⁸⁶.

Las mutaciones en *CTNNB1* parecen ser independientes de la presencia de MSI o de mutaciones de *PTEN* y *KRAS*, lo que sugiere que la vía *Wnt* podría desempeñar un papel independiente en el cáncer de endometrio⁶².

Las alteraciones en *CTNNB1* se han descrito en hiperplasias de endometrio que contienen áreas de metaplasia escamosa (mórulas). Este dato, junto con el hecho de que las mutaciones se han observado de forma homogénea en distintas áreas tumorales, sugiere que las alteraciones de β -catenina ocurren en los primeros pasos de la tumorigénesis del endometrio⁸⁷.

Aunque los datos son controvertidos respecto la importancia pronóstica de las mutaciones en *CTNNB1*, probablemente se producen en los tumores en fase inicial, asociados con pronóstico favorable⁶¹.

1.5.6. E-cadherina

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión, esenciales para la conexión entre las células. E-cadherina está codificada por el gen *CDH1* y se localiza en el cromosoma 16q22.1⁸⁸.

Varios estudios han reportado que podría actuar como un gen supresor de tumores, ya que la pérdida de su función favorece la progresión tumoral, la invasión local y el desarrollo de metástasis⁸⁹. La pérdida de expresión parcial o completa de E-cadherina se correlaciona con un comportamiento agresivo en el CE⁷². La disminución de la expresión de E-cadherina es frecuente en el CE y puede estar causada por LOH o por hipermetilación del promotor. La LOH en 16q22.1 se ha observado en casi el 60 % de los CENE, pero en sólo el 22 % de los CEE⁶¹.

1.5.7. TP53

El gen supresor de tumores *TP53* se localiza en el cromosoma 17p13. Si existe daño en el ADN, *TP53* provoca la detención del ciclo celular mediante la inhibición la fosforilación de la ciclina-D1 y del gen del retinoblastoma (*Rb*), promoviendo así la apoptosis⁶².

Mientras que las mutaciones de *TP53* se producen en el 90 % de los CENE, sólo están presentes en el 10-20 % de los CEE, que son en su mayoría de alto grado⁶¹. La expresión anormal de *TP53* se ha encontrado en el 11 % de los CEE de grado 1⁹⁰. Este hallazgo apoya que las mutaciones de *TP53* pueden influir en la progresión de CEE a CENE⁷². De hecho, la mutación de *TP53* es la alteración genética más característica de los CENE, y puede ser útil en su distinción de los CEE.

La sobreexpresión de p53 se asocia con aneuploidía⁹¹, un alto grado histológico⁹², estadios avanzados, mayor tasa de recaída⁹³ y con un pronóstico desfavorable⁹⁴.

1.5.8. p16

p16 es una proteína que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. Esta proteína está codificada por el gen *CDKN2A*, un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 9p21. La inactivación de p16 puede conducir a un crecimiento celular

incontrolado, y se produce más frecuente en los CENE (40-45 %) que en los CEE (10 %)⁶².

El mecanismo subyacente no está del todo esclarecido, porque no se han identificado fenómenos de hipermetilación del promotor ni delección o mutaciones⁷¹.

La pérdida de expresión de p16 se correlaciona con mutaciones de *KRAS* y de *TP53*, y se asocia con estadios avanzados, alto grado y supervivencia disminuida⁵⁹.

1.5.9. HER-2

El receptor del factor de crecimiento epidérmico II o *HER2/neu* es un oncogén que codifica el receptor de una tirosina quinasa transmembrana implicada en la señalización celular y que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17q12.

La sobreexpresión y amplificación de *HER2* se observa con mayor frecuencia en los CENE que en los CEE⁹⁵ (43 % y 29 %, respectivamente), y se ha asociado con parámetros de pronóstico adverso, incluyendo estadios avanzados, alto grado histológico y baja supervivencia global⁷⁰.

1.5.10 Vías de señalización con FGF

Varios estudios sugieren la importancia de la vía de señalización de los factores de crecimiento de fibroblastos (*FGF*) en los CE. Los CE presentan de forma frecuente la inactivación de Sprouty -2, una proteína implicada en la regulación negativa de la vía del receptor de *FGF* (*FGFR*) por metilación del promotor⁹⁶. Las mutaciones somáticas en *FGFR2* se han detectado en el 12,6 % de los CE, particularmente en los carcinomas de tipo endometriode⁹⁷. Curiosamente, las mutaciones en *FGFR2* y *KRAS* parecen ser mutuamente excluyentes, mientras que las mutaciones en *FGFR2* y *PTEN* coexisten de forma frecuente⁶³.

1.5.11. Genes de receptores hormonales

Los receptores de estrógeno (α y β) y los receptores de progesterona (PR-A, PR-B) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Son factores de transcripción implicados en la señalización mediada por hormonas, así como en la inhibición de la expresión génica, y la proliferación y diferenciación celular en diversos tejidos⁹⁸.

En el útero, el subtipo predominante de receptor estrogénico es ER α . Se ha observado que el ARNm de ER α y su expresión proteica van disminuyendo de forma gradual en carcinomas de grado 1 a grado 3. En contraste, la expresión de ER β no se altera, lo que sugiere un cociente ER α /ER β disminuido en los casos de CE de alto grado⁹⁹.

La progesterona actúa como un regulador negativo fisiológico de la acción de los estrógenos en el endometrio. El receptor de progesterona presenta dos isoformas

distintas: PR-A, que actúa como un represor transcripcional y PR-B como un activador¹⁰⁰. El papel del PR-A en el endometrio consiste en regular de forma negativa la acción de los estrógenos a través de la represión de la activación del ER α .

La alteración de la expresión de isoformas también se ha observado en casos de hiperplasia atípica, por lo que podrían constituir las primeras alteraciones en el desarrollo del CE¹⁰¹.

Las principales vías que intervienen en el CE se pueden observar en la Figura 4.

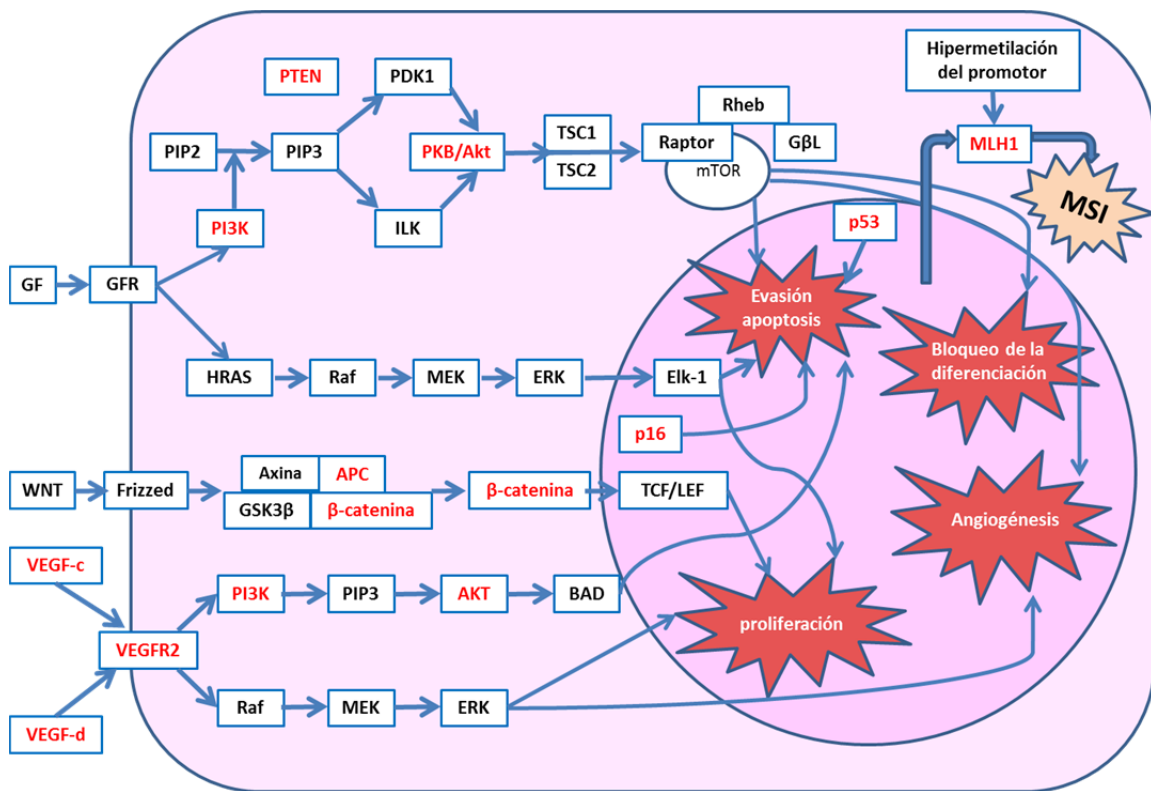


Figura 4. Dibujo esquemático que incluye las vías de señalización del CE. Adaptado de Xianyong et al¹⁰²

1.6. Transición epitelio-mesénquima (TEM) y angiogénesis

1.6.1. La transición epitelio-mesénquima y su relación con el CEE

La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico que se caracteriza por una alteración fenotípica y funcional en las células tumorales que incluye la pérdida de características epiteliales, como la pérdida de la polarización y cohesividad celular, junto con la adquisición de características propias de células mesenquimales, como son el aumento de la capacidad migratoria, una mayor resistencia a la apoptosis y la adquisición de propiedades de una célula pluripotencial. La TEM se asocia con la desestabilización de

las uniones intercelulares, la remodelación y sustitución de los componentes del citoesqueleto y la supresión de la apoptosis^{103,104}.

Este fenómeno no sólo promueve la pérdida de cohesividad de las células neoplásicas y la invasión estromal en el lecho tumoral primario, sino que además otorga resistencia a la anoikis (que es una forma de muerte celular programada inducida por las células dependientes del anclaje de la matriz extracelular) y permite la supervivencia intravascular, fenómenos de extravasación y la implantación inicial metastásica.

Se han identificado muchos factores, tanto intracelulares como extracelulares, que pueden inducir la TEM. Estos últimos incluyen citoquinas y factores de crecimiento, tales como Snail, Twist y Zeb, que intervienen en numerosas vías de señalización de la TEM, identificándose cinco vías principales¹⁰⁵: receptores de tirosina quinasas (EGFR, FGF, HGF, PDGFR, IGF) e integrinas y TGF- β , NF- κ B, Wnt y Notch. Estas vías están interrelacionadas a su vez con otras vías de señalización, como Akt, GSK3, Rho-GTPasas y SMAD. La activación de los genes represores de la transcripción de la E-cadherina (Twist, Snail, Slug y Zeb) conduce por tanto a la pérdida de su expresión en las células tumorales. La interacción de estos reguladores con sus respectivos intermediarios puede apreciarse en la Figura 5.

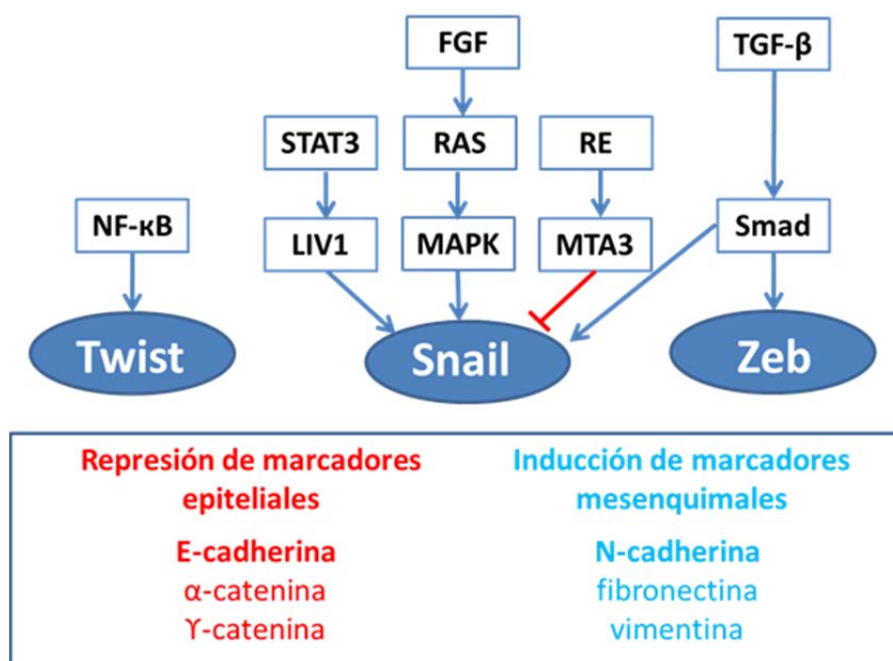


Figura 5. La sobreexpresión de los reguladores de la TEM, tales como Twist, Snail y Zeb, conduce a un cambio en el perfil de expresión génica que culmina en la disminución de la expresión de la E-cadherina. Adaptado de Yibin et al¹⁰⁶

El dominio extracelular de E-cadherina interviene en la adhesión con otras moléculas de cadherina de las células vecinas, y el dominio intracelular interactúa con proteínas citoplasmáticas que transmiten la señal de adhesión y anclan complejos de unión al

citoesqueleto de la actina¹⁰⁷. La E-cadherina también participa en otros tipos de unión, como desmosomas y uniones estrechas, fundamentales para el mantenimiento de la morfogénesis y de la integridad de los tejidos¹⁰⁸. Además, la E-cadherina actúa como un supresor tumoral, inhibiendo los procesos de invasión y metástasis, y con frecuencia es reprimida o degradada durante la transformación neoplásica¹⁰⁹.

En algunos estudios se ha observado que la supresión de la E-cadherina también se correlaciona con un pronóstico adverso en el CE, pero no está claro si actúa como un factor independiente de otros factores, como el subtipo histológico y el grado. Un estudio llevado a cabo por Montserrat y colaboradores¹¹⁰ reportó que los represores de la E-cadherina (Slug, Zeb1 y HMGA2) se expresaban preferentemente en el frente mioinvasivo de los CE, y que los cambios de la TEM podrían ser inducidos a través de la fosforilación de la vía de *ERK 1/2*. En esta misma línea argumental, un estudio de Kyo¹¹¹ demostró que Twist se expresaba preferentemente en el margen invasivo del tumor en una serie de CEE. Estos hallazgos sugieren que la TEM puede contribuir hacia la progresión del CE y hacia un comportamiento más agresivo del tumor.

Los primeros trabajos del grupo de Fujimoto demostraron que los niveles de E-cadherina disminuían significativamente con la menor diferenciación del CE, mientras que se relacionaban inversamente con la profundidad de invasión del miometrio, así como con la presencia de metástasis en ganglios paraaórticos. Estos hallazgos indican que la disociación de las células cancerosas debido a la disminución de la expresión de la E-cadherina facilita la invasión tumoral en el CE¹¹².

1.6.2. Importancia de la TEM en el CEE: más allá de la invasión

Aunque está claro que la TEM está involucrada en eventos metastásicos en el cáncer, parece que tiene un papel importante en muchos otros procesos, tales como proliferación y supervivencia celular y angiogénesis, lo que indica que los represores de la E-cadherina cumplen otras funciones adicionales más allá de la represión de *CDH1* y la inducción de la TEM.

La vía del TGF- β promueve la invasión tumoral y la evasión de la vigilancia inmunológica en estadios avanzados del CE, regulando la apoptosis y la supervivencia¹¹³. TGF- β es un potente inductor de la expresión de Snail, que además de su papel represor de la E-cadherina ya comentado, proporciona a las células una mayor resistencia a la muerte celular¹¹⁴. Esta actividad favorece por tanto la supervivencia celular; una propiedad que comparte con Twist, ya que antagoniza con el efecto proapoptótico mediado por *MYC*¹¹⁵.

El proceso de la TEM también puede conferir resistencia a una senescencia prematura celular. Twist, en concreto, previene la senescencia inducida por oncogenes, inhibiendo p16 / ink4a y p21 / cip¹¹⁶. Además, Snail junto con Twist favorecen la adquisición de resistencia a los agentes quimioterápicos de las células cancerosas, permitiendo la supervivencia de las células tumorales¹¹⁷. Estos hallazgos sugieren que la abrogación de la senescencia puede ser un mecanismo asociado con la TEM, que favorece la supervivencia

de las células metastásicas mediante la supresión de dos de los principales mecanismos de salvaguardia contra el cáncer: la senescencia prematura y la apoptosis.

Otro aspecto importante de las células que se someten a la TEM es la adquisición de las características propias de una célula madre pluripotencial¹¹⁸. Estas células indiferenciadas se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y perpetuación, junto con la adquisición de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina y distintas metaloproteasas. Este fenotipo mesenquimal mejora su capacidad para preservar las propiedades migratorias y una mayor adaptabilidad a la respuesta a estímulos durante la expansión tumoral.

Otro mecanismos que están siendo objeto de estudio son los derivados de la evasión de la vigilancia inmunológica¹¹⁹, al inducir fenómenos de tolerancia o modificando su propio fenotipo, y la influencia a la respuesta inflamatoria del microambiente tumoral. Esta última ha cobrado importancia debido al descubrimiento de la inducción de SNAI1 por la acción de la ciclooxigenasa 2 (COX2) y de SNAI1 y ZEB a través del factor nuclear κ B (NF- κ B) y algunas interleucinas^{120,121}. Además, en el estroma proliferan fibroblastos asociados al cáncer (*CAF*, de las siglas *cancer associated fibroblasts*), que facilitan la inducción de la TEM y conducen a la progresión metastásica¹²². Se ha sugerido un papel importante de CXCL12 (SDF1) y sus receptores en la regulación del proceso de formación de metástasis debido a que se descubrió que los CAF liberaban CXCL12, que se relaciona con un fenotipo más agresivo del tumor¹²³.

1.6.3. Relación del proceso de la TEM con la angiogénesis

El crecimiento de las células tumorales requiere un aumento en la vasculatura local para proporcionar metabolitos y oxígeno. Las células se ajustan, desde un punto de vista nutricional, a un ambiente hipóxico, mediante la activación específica de vías asociadas con el metabolismo, la glucólisis, la resistencia a la toxicidad inducida por la acidosis y la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso de neovascularización producido por la proliferación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. En los tumores, juega un papel clave en la proliferación incontrolada de las células, facilitando la supervivencia de las células malignas y su invasión tanto a nivel local como a distancia.

Los primeros trabajos que relacionaban la angiogénesis con un peor pronóstico en CE fueron los de Kirschner¹²⁴ y Kaku¹²⁵. Posteriormente, varios investigadores reportaron la asociación de la angiogénesis con factores histológicos desfavorables, como menor grado de diferenciación, afectación miometrial profunda, invasión linfovascular y estadio avanzado¹²⁶.

La formación de nuevos vasos en el CE depende de la interacción entre distintas hormonas y factores de crecimiento, y puede ser estimulada o inhibida por múltiples reguladores¹²⁷. El endometrio expresa varios factores de crecimiento implicados en la angiogénesis, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de

crecimiento transformante (TGF- β) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Además de estos factores, existen numerosas interacciones con el microambiente tumoral, que interviene en la regulación de los promotores de la TEM. Estas relaciones han sido objeto de múltiples estudios, que relacionaron la sobreexpresión del receptor 1 del factor de crecimiento epitelial vascular (VEGFR1) con la regulación positiva de SNAI1, SNAI2 y TWIST¹²⁸ y con la participación activa de estos factores en la angiogénesis¹²⁹. Estos datos apoyan la influencia mutua del tumor y los componentes de su microambiente en el control dinámico de la TEM y la respuesta angiogénica durante la progresión tumoral.

Por otra parte, la hipoxia es una condición frecuente que ocurre en las neoplasias malignas, principalmente debido al suministro de sangre insuficiente resultante del rápido crecimiento de las células tumorales¹³⁰. La hipótesis que relaciona la hipoxia y la TEM ha sido reforzada debido a su relación con distintos factores que intervienen en la invasión miometrial del CE y el desarrollo de metástasis. Bajo condiciones hipóxicas, la estabilización del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1) induce la formación un complejo transcripcional funcional que permite la transcripción de genes implicados en la respuesta a la hipoxia¹³¹, regulando de manera directa o indirecta la expresión de los represores de la E-cadherina¹³² y otros productos transcripcionales que regulan la proliferación celular y la invasión^{133,134}. Este hecho se correlaciona histológicamente con fenotipos tumorales agresivos, con una mayor resistencia a agentes quimioterápicos y a mal pronóstico^{135,136}. Por tanto, parece que el sistema de HIF1 y su interrelación con los represores de la E-cadherina ejerce un papel crítico en la progresión del CE, así como en la adquisición del potencial metastásico. Ver Figura 6.

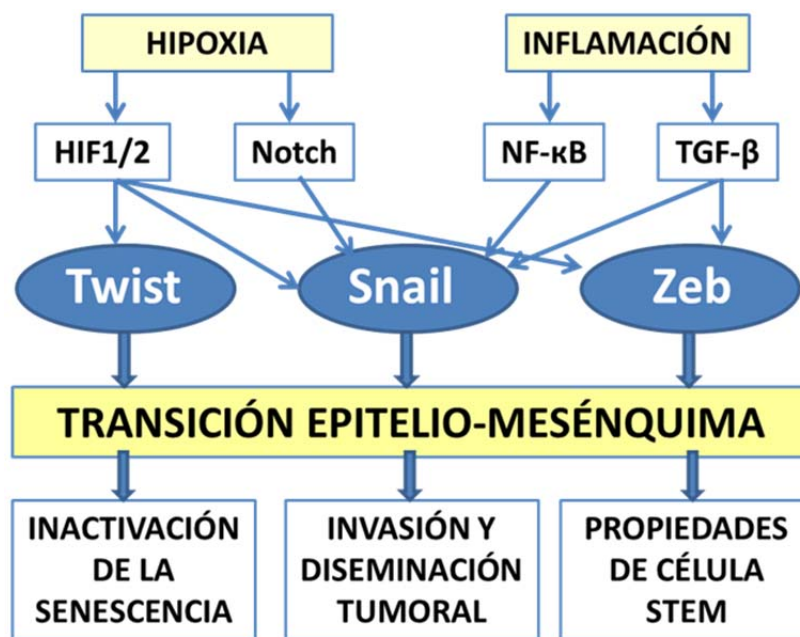


Figura 6. La TEM actúa como un agente promotor de metástasis. La hipoxia del microambiente tumoral y la inflamación favorecen la inducción de la TEM. Tanto Twist como Snail confieren

propiedades de las células madre, favoreciendo la autorrenovación de una pequeña población de células que pueden colonizar otros tejidos a distancia. Twist también inactiva el mecanismo de la senescencia celular desencadenada por oncogenes. Adaptado de Thiery et al. Cell 2009¹³⁷.

1.6.4. El estado transitorio de la TEM y su relación con la pluripotencialidad

Varios estudios han postulado que las células cancerosas pueden someterse a una TEM parcial, que coincide con la expresión simultánea de ambos genes epiteliales y mesenquimales¹³⁸. La naturaleza transitoria de la TEM permite que las células cancerígenas mesenquimales adquieran nuevamente un fenotipo epitelial para poder establecerse en nuevos tejidos y órganos^{139,140}. Brabletz¹⁴¹ apuntó dos escenarios diferentes que relacionan la TEM y las características propias de las células madre: 1) la TEM y la pluripotencialidad son dos procesos enlazados que conducen a la formación de células cancerígenas migratorias, asociadas a la expresión de Twist1; y 2) la TEM y la pluripotencialidad son eventos independientes, en el que las células tumorales adquieren propiedades migratorias de la TEM, pero a cambio de su pluripotencialidad¹⁴². Es interesante señalar que Ombrato y Malanchi han sugerido recientemente que un programa de TEM temprano se correlacionaría con una mayor capacidad pluripotencial cancerígena a través de una ganancia de plasticidad epitelial, mientras que un estado avanzado de la TEM conduciría a un fenotipo mesenquimal menos flexible¹⁴³. En este modelo de «gradiente de la TEM», la activación de este proceso podría presentar diferentes umbrales para asociarse a una capacidad invasora mesenquimal o de una célula pluripotencial epitelial tras la colonización metastásica. Ver Figura 7.

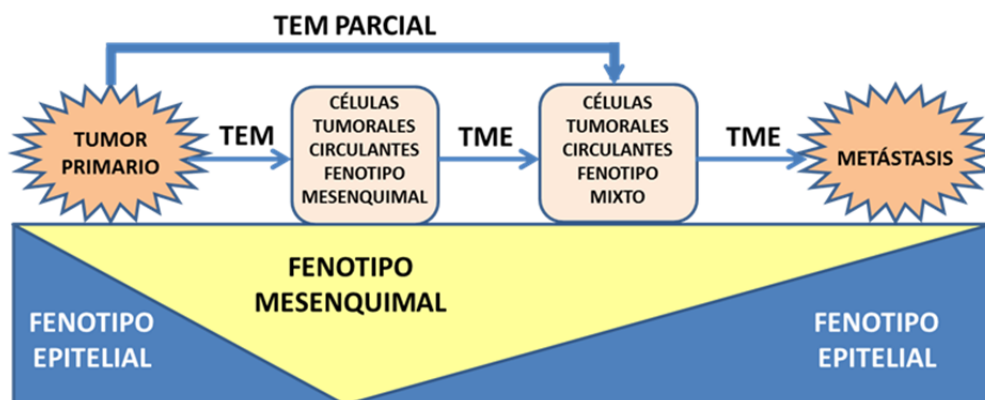


Figura 7. Esquema que representa la activación de la transición epitelio-mesénquima, que puede presentar diferentes umbrales para adquirir un fenotipo mixto para volver a sus características epiteliales. Adaptado de Fabregat et al 2016¹⁴².

1.7. Clasificación molecular del cáncer de endometrio: aportaciones del TCGA

Estudios de secuenciación de ADN con muestras de CE de distintos subtipos histológicos grados han puesto de manifiesto que las mutaciones de *PTEN* ocurren como un evento temprano en la carcinogénesis de los tumores de tipo I⁶⁰ y coexisten frecuentemente con otras mutaciones de la vía *PI3K-AKT*¹⁴⁴. Otros genes comúnmente mutados son

FGFR2, *ARID1A*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *PIK3R1* y *KRAS*^{145,146}. La inestabilidad de microsatélites (MSI) se encuentra en aproximadamente un tercio de los tumores de tipo I¹⁴⁷, y es poco frecuente en los de tipo II, en los que las mutaciones de *TP53*, *PIK3CA* y *PPP2R1A* son las más frecuentes¹⁴⁸.

El *Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network* presentó en 2013 el primer análisis genómico completamente integrado a gran escala de los CE, con secuenciación de todo el exoma, transcriptoma, análisis del número de copias del genoma, perfiles de expresión, metilación, arrays de proteínas de fase inversa y evaluación de MSI en 186 CEE, 42 carcinomas serosos y 4 CE de histología mixta¹⁴⁹. Un subconjunto de casos (107) también fue sometido a secuenciación del genoma completo para identificar las variantes estructurales.

Los resultados de este análisis sugirieron que el modelo dualista tradicional propuesto por Bohkman puede mejorarse con la clasificación del CE en cuatro subgrupos moleculares con importancia pronóstica: un grupo con mutaciones de la ADN polimerasa *POLE* o ultramutados, tumores con inestabilidad de microsatélites o hipermutados, tumores con número de copias alto (seroso-like con mutaciones de *TP53*) y un subgrupo con un número de copias bajo, en que no se identifican alteraciones específicas, y que suele englobar a CEE de bajo grado. A continuación, comentaremos brevemente las características de cada uno de estos subgrupos, así como las alteraciones moleculares más relevantes que presentaron.

1.7.1. Subgrupo ultramutado o con mutación de *POLE*

Este fenotipo ultramutado tiene como característica principal la presencia de mutaciones somáticas en el dominio exonucleasa de *POLE*, un gen que codifica la subunidad catalítica de una polimerasa que regula la progresión del ciclo celular, la remodelación de la cromatina y la reparación del ADN^{150,151}.

En el estudio del TCGA se descubrieron 190 genes mutados significativamente en este grupo. Las vías moleculares alteradas en este subgrupo regulan procesos de gluconeogénesis y glucólisis, la endocitosis mediada por la señalización de clatrina, la carga ARN y la señalización del citoesqueleto de actina.

El 6,4 % de los CEE de bajo grado y el 17,4 % de los de alto de este estudio correspondieron a este subgrupo. Aunque el número de CE ultramutados que se han descrito hasta el momento es pequeño, es conveniente destacar que la supervivencia libre de progresión de las pacientes de este grupo es la más favorable de los subgrupos moleculares.

1.7.2. Subgrupo hipermutado o con inestabilidad de microsatélites

El grupo de inestabilidad de microsatélites (MSI) o hipermutado estaba formado por tumores con MSI con escasas alteraciones en el número de copias. Consistente con su fenotipo MSI, este grupo mostró de forma frecuente metilación del promotor de *MLH1*

y, por tanto, una expresión reducida del gen *MLH1*, así como un fenotipo metilador de islas CpG. En la cohorte de tumores del estudio, el 28,6 % de los CEE de bajo grado y el 54,3 % de los de alto se hallaron dentro de este subgrupo. Esta observación es consistente con estudios anteriores que reflejan que los tumores con MSI se presentan con mayor frecuencia en CEE de alto grado que en los de bajo grado^{147,152}.

Se identificaron 21 genes mutados de manera significativa en este subgrupo, incluyendo 11 genes (*ARID5B*, *CSDE1*, *CTCF*, *GIGYF2*, *HIST1H2BD*, *LIMCH1*, *MIR1277*, *NKAP*, *RBMX*, *TNFAIP6*, *ZFHX3*) que no estaban previamente reconocidos en la patogénia del CE. La vía de *RTK/RAS/β-catenina* y la de *PIK3CA-PIK3R1-PTEN* estaba alterada en el 69,5 % y 95,5 % de los tumores hipermutados respectivamente. Las alteraciones del gen *KRAS* se observaron en el 35 % de los casos. Los CEE presentaban mutaciones somáticas en *KRAS* y *FGFR2* más frecuentemente, mientras que las mutaciones de *CTNNB1* fueron más frecuentes entre los tumores MSI-negativos¹⁴⁶.

1.7.3. Subgrupo con estabilidad de microsatélites y bajo número de copias

El subgrupo de bajo número de copias o con estabilidad de microsatélites incluía al 60 % de los CEE de grado bajo, el 8,7 % de los CEE de alto grado, el 2,3 % de los serosos, y el 25 % de los CE con histología mixta.

Se identificaron 16 genes mutados significativamente, de los cuales 9 ya estaban previamente descritos en la patogénia del CE (*PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A*, *PIK3R1*, *KRAS*, *FGFR2*, *CHD4*, *SPOP*) mientras que el papel de los otros 7 (*BCOR*, *CSMD3*, *CTCF*, *MECOM*, *METTL14*, *SGK1*, *SOX17*) no había sido reconocido previamente en la tumorigénesis del CE.

Casi todos los tumores en este subgrupo (92 %) tenían alterada la vía de *PI3K*. *KRAS* estaba mutado en el 16 % de los casos, con una menor frecuencia que en el grupo con inestabilidad de microsatélites¹⁴⁶. La vía *RTK/RAS/β-catenina* también estaba alterada con frecuencia (83 %); dentro de esta vía, las mutaciones de *CTNNB1* fueron particularmente frecuentes (52 %). Las mutaciones en *SOX17*, que regulan la *β-catenina*, se observaron de forma exclusiva en este subgrupo.

1.7.4. Subgrupo con alto número de copias (seroso-like)

El 5 % de los CEE de grado bajo, el 19,6 % de alto grado, el 97,7 % de los carcinomas serosos y el 75 % de los carcinomas mixtos se encuadraron en este subgrupo. Este hallazgo es consistente con estudios anteriores que reportaban que los CS son a menudo aneuploides y cromosómicamente inestables^{148,153}.

El TCGA informó de 8 genes mutados de manera significativa, incluyendo *CSMD3*, *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PIK3R1* y *PPP2R1A*, con funciones ampliamente descritas, y *FBXW7* y *CHD4*. La presencia de mutaciones somáticas en *FBXW7*, *PIK3CA* y *PPP2R1A* en carcinomas intraepiteliales sugiere que las mutaciones en estos genes actuarían como eventos tempranos en el desarrollo del cáncer seroso de endometrio¹⁴⁸.

Otros genes significativamente mutados en los estudios de secuenciación del exoma completo de los CS fueron *SPOP* (un gen supresor de tumores) *CDKN1*, *ATAF1*, *HCFC1R1*, *CTDSPL*, *YIPF3* y *FAM132A*. Podemos concluir que los genes que están involucrados en la remodelación de la cromatina y la degradación de proteínas mediada por ubiquitina están mutados con frecuencia en este tipo de cáncer¹⁵⁰.

Este grupo presentó frecuentes anomalías genómicas en cuanto al número de copias, que afectaban a genes como *MYC*, *HER2*, y *CCNE1* (ciclina E1), con amplificaciones focales en cada uno en el 23-25 % de los casos. También se observó que la mayoría de los CS con amplificación de *HER2* también presentaban mutaciones de *PIK3CA*. La vía de *PIK3CA-PIK3R1-PTEN* estaba alterada en el 73 % de los casos, mientras que la vía de *KRAS* estaba mutada o amplificada solamente en un 8 %¹⁴⁹.

Además, una gran proporción de estos tumores (85 %) se caracterizaba por las anomalías de genes implicados en la regulación del ciclo celular¹⁴⁹.

2. HIPÓTESIS

El cáncer de endometrio es el tumor maligno más frecuente del tracto genital femenino en países desarrollados. Aunque la mayoría de las veces se diagnostica en estadios iniciales, en torno a un 20 % de los casos se presenta como enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico o se produce una recaída en el curso de la enfermedad.

El desarrollo de perfiles de expresión génica implicados en la carcinogénesis del carcinoma de endometrio de tipo endometriode (CEE) contribuiría a esclarecer el papel que desempeña la regulación de genes que intervienen en el ciclo celular, la angiogénesis y la transición epitelio-mesénquima en la evolución de estos tumores; en última instancia, este mejor conocimiento de la patología molecular del CEE permitiría identificar un gen o conjunto de genes con valor pronóstico, y podría contribuir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Las hipótesis de este estudio se han definido de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: Los grupos de pacientes definidos por el perfil de expresión de genes analizado por RT-qPCR no difieren en la tasa de supervivencia global o libre de enfermedad en un tiempo determinado.
- Hipótesis alternativa: El perfil de expresión de genes analizado por RT-qPCR establece dos grupos de pacientes que presentan diferencias significativas en la tasa de supervivencia global o libre de enfermedad.

3. OBJETIVOS

El estudio de la expresión génica en una serie de CEE servirá para detectar posibles marcadores pronósticos que permitan predecir su progresión, así como identificar potenciales dianas terapéuticas. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Realizar un análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas de nuestra casuística para comprobar si existe una correlación con la mortalidad o la recidiva en el curso de la enfermedad y comparar los resultados de nuestra serie con los datos publicados en la literatura.
2. Elaborar un perfil de expresión génica basado en genes implicados en la patogenia del CEE, especialmente relacionados con la TEM, la angiogénesis y el ciclo celular, que sirva como marcador pronóstico, y establecer su asociación con otros factores clínico-patológicos en relación con la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.
3. Identificar genes que pudieran ejercer un papel relevante como potenciales dianas terapéuticas en el CEE.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes y variables clínico-patológicas

El presente estudio se realizó en 46 pacientes diagnosticadas de carcinoma de endometrio de tipo endometrioides (CEE) en diferentes estadios y sin ningún tipo de tratamiento previo a la intervención quirúrgica en el Hospital Universitario La Paz entre febrero de 1996 y diciembre de 2003. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz.

Se aplicaron los siguientes criterios para la inclusión de las pacientes en el estudio:

- Diagnóstico anatomopatológico de CEE.
- Disponibilidad de muestra incluida en parafina con al menos un 80 % de celularidad tumoral sin áreas de necrosis.
- Seguimiento clínico durante al menos 120 meses desde la finalización del tratamiento.

A continuación se enumeran las variables clínicas y anatomopatológicas recogidas de forma retrospectiva para realizar el estudio:

- Edad al diagnóstico.
- Grado de diferenciación según los criterios establecidos según las clasificaciones de WHO de 2003 y de la FIGO 2009, en G1, G2 y G3, según el porcentaje de componente sólido no escamoso.
- Tamaño tumoral.
- Afectación miometrial.
- Estadio: Según los criterios definidos de la FIGO 2009.
- Invasión linfovascular.
- Presencia de hiperplasia compleja con atipia.
- Supervivencia libre de enfermedad (SLE). La SLE se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la recaída o hasta la fecha de la última visita, en el caso de que no se produjera la recaída.
- Supervivencia global (SG). La SG se definió como el intervalo de tiempo comprendido entre el diagnóstico y la fecha del fallecimiento de la paciente o de la última revisión.

4.2. Selección de genes

Se seleccionaron genes en los que se ha descrito previamente algún tipo de implicación en el proceso de carcinogénesis, así como genes que han sido descritos como moduladores en el desarrollo del cáncer de endometrio. De esta forma, tras una extensa revisión de la literatura, se seleccionaron 76 genes (Tabla 1 del anexo).

Una vez seleccionados los genes de interés, se hizo la búsqueda de las secuencias de referencia para cada uno de ellos, en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), mediante el código *Unigene*. Sobre la secuencia de referencia, se seleccionaron sondas específicas para cada uno de los genes en estudio, así como para los genes de referencia, mediante el software *Taqman Gene Expression Arrays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU). Con dichas sondas se configuraron las tarjetas microfluídicas (TLDA; *Taqman Low Density Array*) para realizar el análisis de expresión génica.

Los genes de referencia, también llamados controles endógenos o *housekeeping* (HK), son aquellos genes cuya expresión, a priori, no varía de una muestra a otra, por lo que nos sirven para determinar si tenemos la misma cantidad de ARNm en las muestras analizadas. Al analizar muestras conservadas en parafina es preciso emplear más de un control endógeno para evitar artefactos por eventos tales como la degradación del material. En este estudio la expresión de los genes HK seleccionados fue analizada mediante el algoritmo geNorm versión 3.4. Este programa, realiza básicamente dos análisis: uno de evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados y otro que valora el número idóneo de los que debemos utilizar para el proceso de normalización. Es recomendable emplear al menos tres genes normalizadores (los más estables) y añadir otros nuevos hasta que la inclusión de éstos no contribuya significativamente a la modificación del factor de normalización¹⁵⁴.

En nuestro caso, se identificaron ocho genes (*18S*, *B2M*, *GUSB*, *HMBS*, *IPO8*, *PPIA*, *TBP* y *TFRC*) cuya combinación resultaba la más apropiada para normalizar los resultados. A partir de los ocho genes seleccionados se calculó un factor de normalización basado en su media geométrica, que se aplicó en los valores crudos de Ct de los genes a estudio.

4.3. Procesamiento de las muestras

Las muestras tisulares se fijaron en formol al 4 % y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales aplicados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que, posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los casos fueron revisados para confirmar el diagnóstico.

Para el estudio molecular se obtuvieron entre 4 y 8 secciones adicionales de 4 µm de espesor. El procesamiento posterior de las muestras se realizó siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación: aislamiento del ARN total, síntesis del ADN

complementario (ADNc), reacción de amplificación mediante RT-qPCR y medida de la expresión génica.

4.3.1. Aislamiento de ARN total

El ARN total fue aislado mediante la utilización del kit *Masterpure RNA Purification* (Epicentre, Madison, WI, EE.UU.), específicamente diseñado para muestras parafinadas, siguiendo el protocolo de la casa comercial con mínimas modificaciones. La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría en Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), midiendo la absorbancia a las longitudes 260 y 280 nm. La calidad del ARN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El ARN total aislado se almacenó a -80°C hasta su utilización.

4.3.2. Síntesis del ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 μg hasta 10 μg de ARN en ADNc, en un volumen de 50 μL . La síntesis de ADNc se realizó a partir 1 μg de ARN total de cada una de las muestras. La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del kit. Los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

4.3.3. Análisis de la expresión génica

El análisis de la expresión génica por RT-qPCR se realizó con el sistema *Taqman Gene Expression Assays*. Una vez seleccionadas las sondas y cebadores para los genes de interés, se utilizó como soporte una tarjeta TLDA que permite el análisis de 384 pocillos. Cada tarjeta fue configurada para el análisis de 84 genes (76 implicados en la carcinogénesis de los tumores de endometrio y 8 genes HK). Los puertos de la tarjeta contenían 50 μl de *Taqman Universal PCR Master Mix* y 50 μl del ADNc correspondiente, cantidad equivalente a 1 μg del ARN total. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). La señal de fluorescencia aumenta de forma exponencial en cada ciclo de amplificación de la PCR. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal, que es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct), y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar. La secuencia de pasos de este proceso se puede observar en la Figura 8.

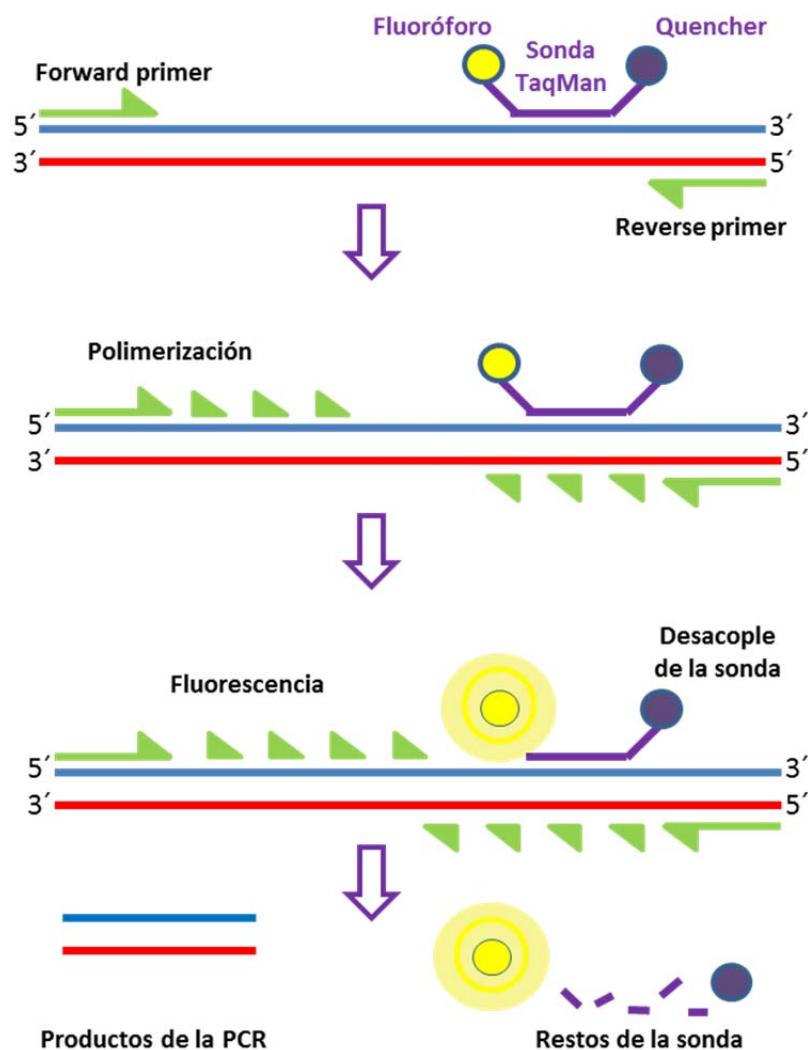


Figura 8. Representación esquemática del análisis con sondas Taqman por RT-qPCR en tiempo real. Primero se añade una sonda específica para un producto, marcada con un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia. Durante el proceso de la PCR, la sonda unida se degrada por la enzima de PCR debido a su actividad 5' exonucleasa, liberando el marcador fluorescente, de manera que la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de la PCR. Por tanto, la monitorización continua de la fluorescencia permite la cuantificación en tiempo real del producto de la PCR. Adaptado de Paik et al.¹⁵⁵

El Ct se calculó con el *software* SDS (versión 2.2) (Applied Biosystems). Los valores crudos de Ct utilizados para la búsqueda de perfiles fueron sometidos a un proceso de normalización, empleando un factor en base a la media geométrica de los 8 HK seleccionados.

4.3.4. Análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con los programas R Statistics (versión 3.2) y SPSS versión 15.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.). En el análisis descriptivo

de las variables clínicas analizadas se recogen los datos cuantitativos como media (rango mínimo-máximo), y los datos cualitativos como frecuencias absolutas y porcentajes. Se analizó el efecto de cada una de las variables clínicas sobre la supervivencia global y libre de enfermedad mediante análisis univariantes.

En cuanto a los datos de expresión génica, se realizó en primer lugar un estudio de correlación entre cada una de las variables, comparándolas una a una. Valores superiores a 0,25 (positivos o negativos) son indicativos de una correlación entre los genes, siendo valores superiores a 0,8 los correspondientes a una correlación fuerte. Este análisis conjunto no puede ser evaluado por métodos estadísticos tradicionales, ya que podría incluir errores y problemas en la identificación de los efectos de las variables.

Para el estudio de supervivencia global respecto a las variables génicas, se realizó un análisis univariante de cada gen mediante regresión de Cox¹⁵⁶. Se añadió el Hazard Ratio (HR) (con un intervalo de confianza (I.C.) del 95 % y su p-valor) de cada gen como variable continua. Se consideraron «genes protectores» aquellos cuyo aumento en la expresión se asociaba con un HR menor de uno, mientras que se consideraron «genes de riesgo» aquellos que se asociaron con un HR mayor de uno. Para la construcción de los modelos de supervivencia global se utilizó el método de *boosting*, considerado el más apropiado para el tamaño y el tipo de la muestra utilizada¹⁵⁷. Este método busca características comunes que se puedan compartir al mismo tiempo entre las distintas categorías a analizar mediante una combinación de varias iteraciones de un mismo algoritmo. Una vez que el proceso ha terminado y se ha asignado un peso a cada predictor intermediario, los clasificadores obtenidos se combinan en un único clasificador final, que además de ser muy preciso, tiene como ventaja principal que disminuye la varianza y el sesgo. También se evaluó la técnica de *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator* (LASSO¹⁵⁸), que es un método de regresión lineal, pero se descartó por problemas de estabilidad y de convergencia del modelo.

El valor predictivo del modelo obtenido fue determinado mediante curvas ROC (*Receiver Operating Curves*), evaluándose en diferentes tiempos de interés: 12, 24, 36, 48, 60 y 120 meses. Se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan Meier en el modelo con la mejor capacidad predictiva, estableciendo dos grupos de riesgo.

En los estudios de supervivencia libre de enfermedad de las variables génicas, también se realizaron análisis univariante mediante regresión de Cox, con los Hazard Ratio, intervalos de confianza (I.C.) y p-valor correspondientes. Se aplicaron los mismos criterios de genes protectores y de riesgo.

Para la construcción de los modelos de supervivencia libre de enfermedad respecto a las variables génicas, se utilizó una combinación de los métodos de *Boosting* y *Lasso* para obtener un modelo conjunto de mayor capacidad predictiva. El valor predictivo de dicho modelo fue también determinado mediante curvas ROC en diferentes tiempos de interés: 12, 24, 36, 48, 60 y 120 meses, realizándose también curvas de supervivencia de Kaplan Meier respecto a dos grupos de riesgo.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínico-patológicas

Las características clínico-patológicas de las 46 pacientes incluidas en este estudio se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables clínico-patológicas.

Grado	N=46	%
1	30	65
2	8	17
3	8	17
Tamaño tumoral	N=44	%
<2cm	17	38,63
2-5cm	24	54,54
>5 cm	3	6,81
Invasión del miometrio	N=46	%
No invasión	5	11
Menor del 50 %	29	63
Mayor o igual al 50 %	12	26
Estadio FIGO	N=46	%
IA	31	67
IB	10	22
II	5	11
ILV	N=37	%
Sí	9	24,32
No	28	75,67
HCA	N=46	%
Presencia	4	8,69
Ausencia	42	91,30
Variable	Media (rango)	Mediana
Edad	62,37 (34-89) años	60,50 años
SLE	137,8 (6,9-279,76) meses	155,26 meses
SG	143,2 (13,93-157,06) meses	157,06 meses

La estratificación de los datos se realizó según los siguientes parámetros: edad (menor o igual a 65 años versus mayor de 65 años). 31 casos presentaban 65 años o menos al diagnóstico (67,4 %), mientras que 15 casos tenían más de 65 años (32,6 %). La media de edad al diagnóstico de la enfermedad fue 62,37 años, con un rango de 34 a 89 años.

Se disponía de datos sobre la cirugía de todas las pacientes. Todas las pacientes fueron tratadas inicialmente mediante histerectomía radical. En el 56,5 % de los casos (26 pacientes) se realizó linfadenectomía pélvica bilateral. En relación al grado histológico, 30 casos se clasificaron como grado 1 de la FIGO (65 %), 8 casos como grado 2 (17 %) y 8 casos como grado 3 (17 %). En 44 de los 46 casos se dispuso del tamaño del tumor. El rango de medidas de la dimensión máxima del tumor oscilaba entre los 3 y los 70 mm, siendo la media de 27,7 mm. Agrupándolos, 17 casos eran menores de 2 cm (38,63 %), 24 medían entre 2 y 4,9 cm (54,54 %) y solo 3 casos eran mayores o iguales a 5 cm (6,81 %). En 5 casos de nuestra serie no se evidenció afectación miometrial en la pieza quirúrgica (11 %), siendo tumores exofíticos. 29 casos (63 %) tenían una invasión miometrial inferior al 50 %, mientras que 12 presentaban invasión miometrial profunda, igual o superior al 50 % (26 %). En 5 casos se observó afectación del estroma cervical (11 %), mientras que el resto (89 %) no se extendían más allá del istmo. La mayoría de los casos diagnosticados correspondían a un estadio IA de la FIGO (31 = 67 %), 10 casos a un estadio IB (22 %) y 5 a un estadio II (11 %). De estos 5 casos, 3 presentaban una infiltración menor al 50 % del espesor miometrial y 2 presentaban afectación miometrial profunda. En nuestra serie, no contamos con ningún caso en estadios avanzados (III o IV).

En 9 casos de 37 casos se observó invasión linfovascular (ILV). En 4 casos se identificaron focos de hiperplasia atípica (HCA) asociados al tumor.

Durante el período de seguimiento de nuestra serie, 9 pacientes sufrieron recaída (19,5 %), y durante el tiempo de seguimiento, fallecieron 17 pacientes (37 %). En la serie analizada, la media de SLE fue de 137,8 meses (6,9-279,8) y la media de SG de 143,2 meses (13,9-279,8).

5.2. Relación de las variables clínico-patológicas y la supervivencia

Se analizó el efecto de las variables clínico-patológicas (grado histológico, tamaño tumoral, invasión miometrial, estadio FIGO, invasión linfovascular y presencia de hiperplasia atípica) sobre la supervivencia de las pacientes mediante un análisis univariante, recogido en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis univariante de las variables clínico-patológicas con la supervivencia

VARIABLE	SLE				SG			
	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor
Grado	4,26	1,12	16,14	0,03	9,65	3,13	29,70	$7,6 \times 10^{-5}$
Tamaño	1,03	0,99	1,08	0,07	1,03	0,99	1,06	0,07
Miometrio	1,77	0,19	15,92	0,60	0,92	0,22	3,68	0,90
Estadio	12,56	2,76	57,13	1×10^{-4}	2,85	0,78	10,43	0,11
ILV	0,61	0,72	5,29	0,66	0,54	0,12	2,47	0,43
HCA	1,51	0,18	12,15	0,69	1,56	0,35	6,83	0,55

El estadio tumoral se asoció significativamente a SLE en nuestra serie, mientras que el grado de diferenciación se asoció tanto a SLE como a SG (Figura 9).

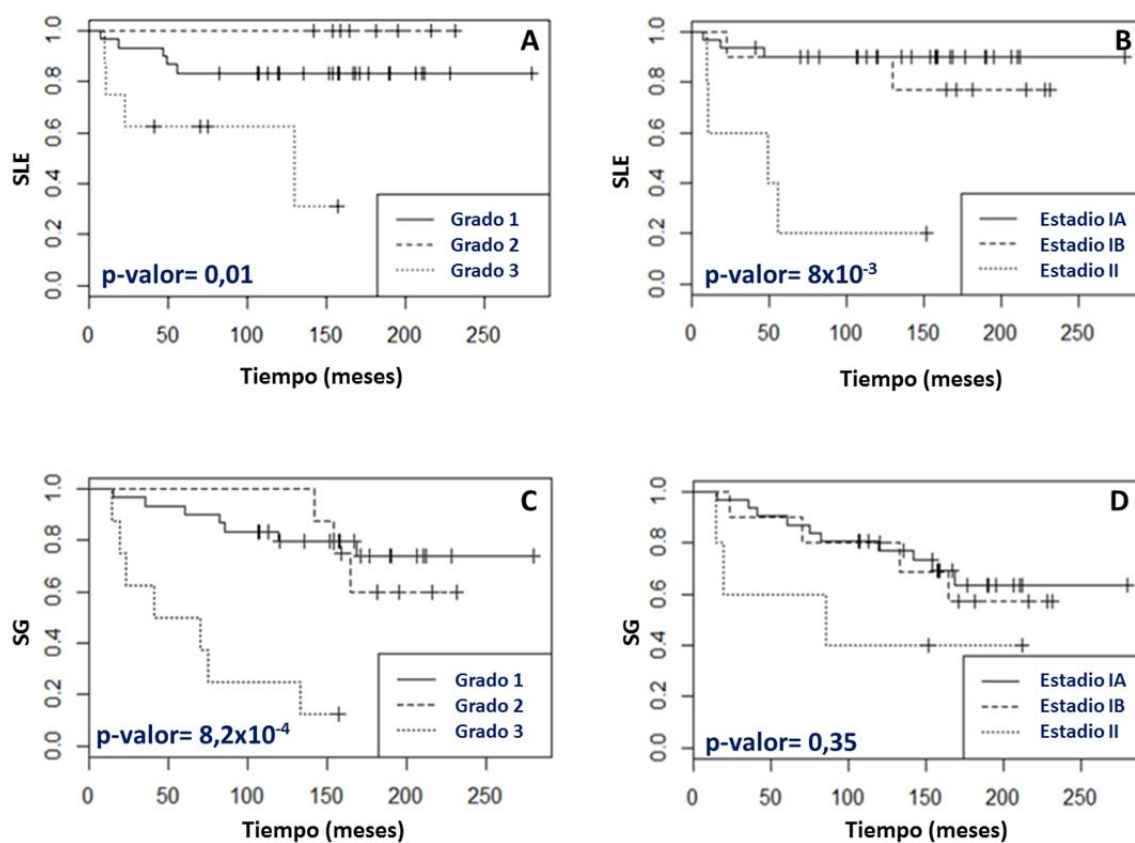


Figura 9. SLE y SG en relación al grado histológico (A, C) y estadio FIGO (B, D) (Kaplan-Meier)

5.3. Análisis de la expresión génica

En el estudio de expresión de genes relacionados con la carcinogénesis del cáncer de endometrio se incluyeron 76 genes relacionados con procesos importantes en la carcinogénesis, como son la transición epitelio-mesénquima (TEM), la angiogénesis y el ciclo celular. El análisis descriptivo de los valores de expresión de los genes incluidos en el estudio se muestra en la Tabla 2 del anexo.

Al tener un tamaño muestral reducido y un número elevado de variables, lo primero que se hizo fue analizar la correlación existente entre cada una de las variables génicas incluidas en el estudio. En la Figura 1 del Anexo se incluyen solamente 19 de las 76 variables génicas que presentaron mayor correlación. En la discusión se analizarán las que tuvieron valores absolutos superiores a 0,85 (positivo o negativo).

Para estudiar la relación de las variables génicas analizadas con la supervivencia, se utilizó un análisis univariante, cuyos datos pormenorizados se incluyen en la Tabla 3 y 4 del anexo para los valores de SLE y SG respectivamente. En relación a la SLE únicamente existe significación estadística para la expresión del gen *PLK2* (HR = 1,47; I.C. 95 % 1,05 – 2,04), y para la SG, para *EGFR* (HR = 1,39; I.C. 95 % 1,01 – 1,90) y *PLK1* (HR = 1,19; I.C. 95 % 0,99 – 1,44). El resumen de los factores significativos se recoge en la Tabla 5, donde se puede observar que todos ellos son factores de riesgo.

Tabla 5. Genes con significado pronóstico en supervivencia.

GEN	SLE				SG			
	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor
<i>PLK2</i>	1,47	1,05	2,04	0,02	1,17	0,89	1,55	0,24
<i>EGFR</i>	1,36	0,91	2,04	0,14	1,39	1,01	1,90	0,05
<i>PLK1</i>	1,08	0,85	1,37	0,51	1,19	0,99	1,44	0,05

5.4. Generación de un modelo de supervivencia basado en las variables génicas

Para la generación de los modelos de supervivencia se aplicaron los métodos de *boosting*¹⁵⁷ y regresión penalizada de *LASSO*¹⁵⁸.

Para SLE, con la metodología de *boosting* se seleccionaron 5 variables, mientras que aplicando el método de *LASSO* fueron 19 variables. Los genes seleccionados por cada metodología se incluyen en la Tabla 6.

Tabla 6. Modelo de SLE: genes seleccionados por las metodologías de *LASSO* y *boosting*

LASSO	<i>AURKB</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDH2</i>	BOOSTING
<i>ESR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FRAP1</i>	<i>ID1</i>	<i>PIK3C3</i>
<i>KIT</i>	<i>KRAS</i>	<i>PDK1</i>	<i>PGR</i>	<i>PIK3CG</i>
<i>PIK3C2B</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>PIK3R3</i>	<i>PIK3R4</i>	<i>PLK2</i>
<i>PIK3R5</i>	<i>PLK2</i>	<i>SNAI1</i>	<i>SPARC</i>	<i>RPS6KB2</i>
				<i>CDH2</i>

Como proceso de selección final, se decidió analizar la concordancia entre ambas metodologías, encontrando 3 variables comunes (*CDH2*, *PIK3CG* y *PLK2*). Este modelo es capaz de identificar dos grupos de pacientes de riesgo en relación a la SLE de forma estadísticamente significativa (p-valor <0,05). (Tabla 7).

Tabla 7. Genes seleccionados para el modelo de SLE

MODELO DE SLE (p-valor= $9,62 \times 10^{-5}$)				
GEN	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor
<i>CDH2</i>	0,42	0,25	0,73	$1,9 \times 10^{-4}$
<i>PIK3CG</i>	1,57	0,98	2,50	0,05
<i>PLK2</i>	2,30	1,48	3,58	$2,1 \times 10^{-5}$

CDH2 tiene un efecto protector, mientras que *PIK3CG* y *PLK2* están considerados factores de riesgo. Decidimos analizar la precisión de este modelo en tiempos concretos, a 12, 24, 36, 48, 60 y 120 meses, mediante curvas ROC. En el caso de la SLE, la predicción es buena, con valores de AUC (área bajo la curva) superiores a 0,9 durante todos los períodos estudiados. Los valores R (AUC) y el p-valor de las curvas ROC se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de R (AUC) y p-valor de las curvas ROC para SLE

SLE		
Tiempo (meses)	R (AUC)	p-valor
12	0,95	0,05
24	0,96	6×10^{-5}
36	0,96	6×10^{-5}
48	0,96	7×10^{-5}
60	0,94	$4,2 \times 10^{-5}$
120	0,94	$4,2 \times 10^{-5}$

Se construyeron también las curvas de supervivencia Kaplan-Meier para este modelo (Figura 10), con un p-valor en el límite de lo significativo (0,05).

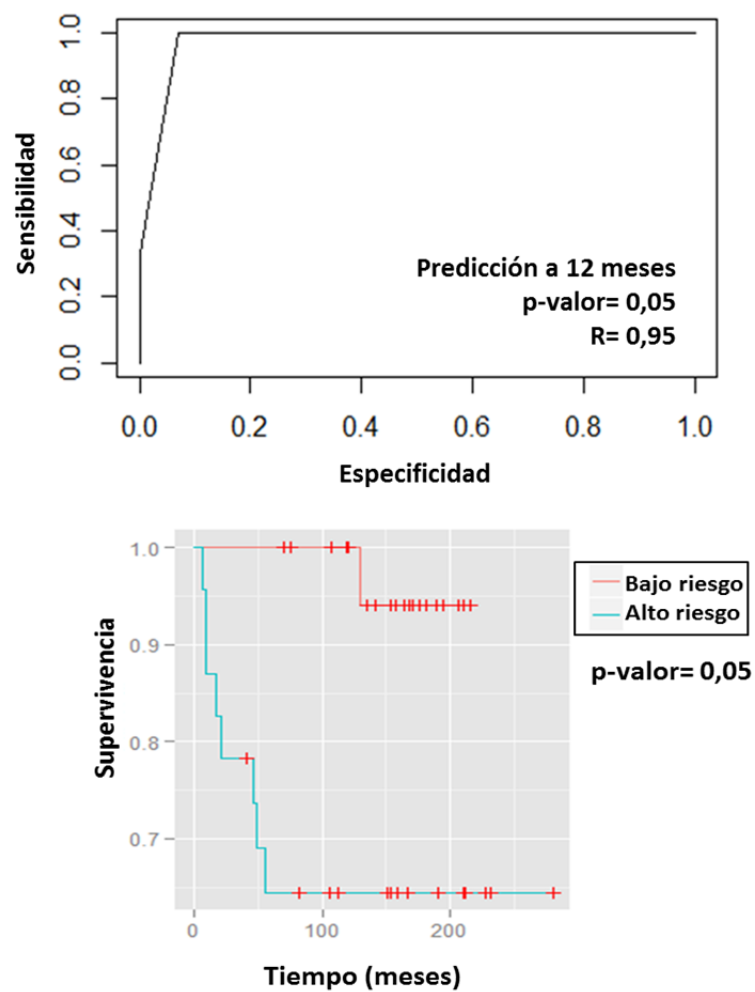


Figura 10. Curva ROC (arriba) y KM (abajo) para el modelo de predicción de SLE

Para el modelo de SG, únicamente se utilizó la metodología de *boosting*, ya que con *LASSO* no existía convergencia del modelo. Se detectaron 10 variables (*EGFR*, *ESR1*, *FGFR2*, *PIK3CG*, *PLK1*, *PLK2*, *RPS6KB2*, *CDH2*, *FLT4* y *VEGF*) resultando este modelo estadísticamente significativo (p -valor $<0,05$). *CDH2*, *FLT4* y *VEGF* tienen un efecto protector, mientras que *EGFR*, *ESR1*, *FGFR2*, *PIK3CG*, *PLK1*, *PLK2* y *RPS6KB2* están considerados factores de riesgo (Tabla 9).

Tabla 9. Genes seleccionados para el modelo de SG

MODELO DE SG (p -valor= $2,09 \times 10^{-6}$)				
GEN	HR	95 % L.I.	95 % L.S.	p-valor
<i>CDH2</i>	0,45	0,28	0,71	$8,4 \times 10^{-5}$
<i>EGFR</i>	1,42	0,81	2,48	0,20
<i>ESR1</i>	2,14	1,30	3,53	$2,5 \times 10^{-4}$
<i>FGFR2</i>	1,39	0,85	2,26	0,18
<i>FLT4</i>	0,75	0,55	1,01	0,06
<i>PIK3CG</i>	2,23	1,43	3,48	$3,9 \times 10^{-5}$
<i>PLK1</i>	1,20	0,82	1,74	0,33
<i>PLK2</i>	1,76	0,98	3,14	0,05
<i>RPS6KB2</i>	1,50	0,81	2,78	0,18
<i>VEGFA</i>	0,41	0,18	0,92	0,03

Igual que para SLE, analizamos la precisión del modelo en tiempos concretos, mediante curvas ROC. En el caso de la SG, la predicción es muy buena, con valores de AUC superiores a 0,95 durante todos los períodos estudiados de 24, 36, 48, 60 y 120 meses. Los valores R y el p -valor de las curvas ROC se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de R (AUC) y p -valor de las curvas ROC para SG

SG		
Tiempo (meses)	R (AUC)	p-valor
24	0,99	$6,5 \times 10^{-4}$
36	0,99	$1,3 \times 10^{-4}$
48	0,99	2×10^{-5}
60	0,99	2×10^{-5}
120	0,95	2×10^{-5}

Se construyeron también las curvas ROC y KM para este modelo (Figura 11). El p-valor obtenido es significativo ($p = 0,004$) y, por tanto, este modelo serviría para separar a los pacientes de nuestra muestra en grupos de alto y bajo riesgo.

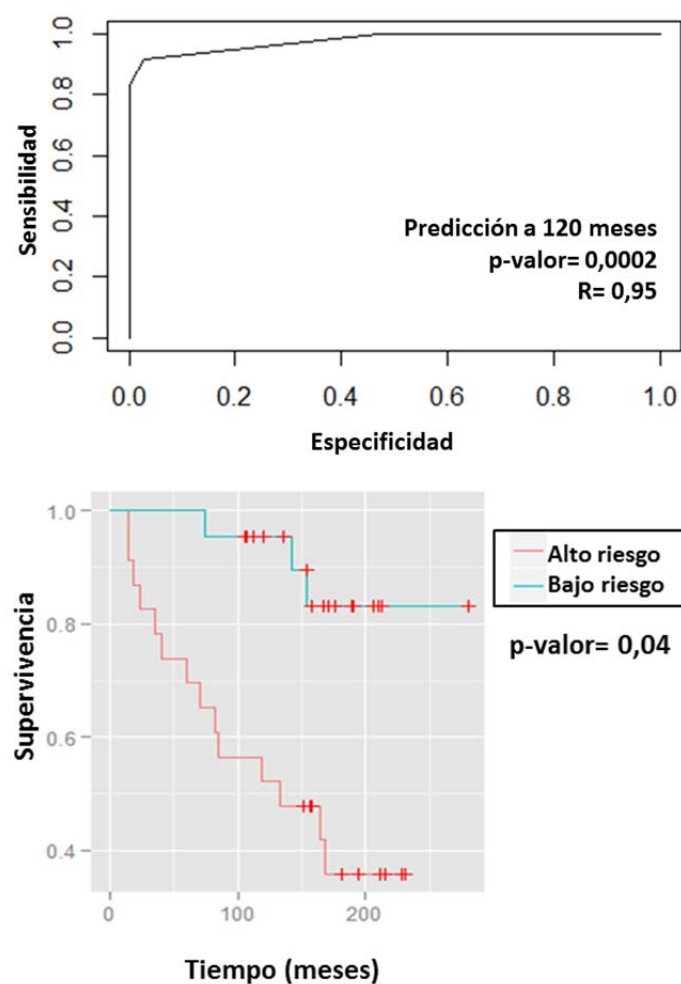


Figura 11. Curva ROC (arriba) y KM (abajo) para el modelo de predicción de SG

6. DISCUSIÓN

6.1. Descripción de la muestra de estudio

6.1.1. Variables clínico-patológicas

La serie de pacientes utilizada para llevar a cabo este estudio muestra las características habituales del CEE, en la que en la mayoría de los casos el diagnóstico se realiza en estadios tempranos de la enfermedad. La media de edad en nuestra serie fue de 62,4 años, prácticamente idéntica a la media descrita de la población global en base a otros estudios, en torno a 63 años¹⁵⁹. Otro aspecto importante en nuestra serie es la homogeneidad del manejo quirúrgico, ya que todas las pacientes fueron sometidas a una histerectomía con doble anexectomía y linfadenectomía pélvica bilateral en caso de infiltración miometrial superior al 50 % o alto grado histológico. Al 56,5 % de las pacientes se les realizó linfadenectomía.

El 19,5 % de las pacientes sufrió recaída durante el período de seguimiento. La tasa de recaída descrita en la literatura es discretamente menor, con cifras que oscilan entre el 9,8 %¹⁶⁰ y el 18 %¹⁶¹, produciéndose principalmente en los primeros años tras el tratamiento quirúrgico de la enfermedad. Una posible explicación de la alta tasa de recaída en nuestra muestra podría ser la presencia de tumores de gran tamaño (el 61,36 % de nuestra serie supera los 2 cm de dimensión máxima) o la afectación cervical (11 %), que se asocian a mayor tasa de recaída¹⁶². En nuestro análisis, el tamaño no ha sido estadísticamente significativo, pero sí lo ha sido el estadio de la enfermedad para SLE.

Por otro lado, el 36,9 % de las enfermas fallecieron, aunque no se ha recogido en este estudio si fue a causa de la enfermedad. La tasa de supervivencia a 5 años de las pacientes que presentan tumores confinados en el útero es del 95 % y disminuye al 67 % en las pacientes que presentan enfermedad regional y a un 17 % en las pacientes con metástasis¹⁶³. En nuestra serie, esta tasa de mortalidad tan elevada en estadios precoces sugiere que probablemente no tenga relación directa con el proceso neoplásico. Además, tal y como se comentará en las limitaciones del estudio, el escaso tamaño de la muestra, junto con la ausencia de confirmación de la muerte por enfermedad tumoral serían dos hechos que justifican una desviación respecto a los datos publicados en la literatura en este aspecto.

No obstante, salvo los datos de mortalidad y de tratarse de una serie pequeña, nuestra muestra es representativa de las características generales de las pacientes diagnosticadas de CE.

El grado histológico ha sido la única de las variables clínico-patológicas estudiadas en este trabajo que ha mostrado un valor pronóstico independiente en la serie de pacientes analizada, tanto para SLE como SG. Nuestra serie muestra una distribución respecto al grado similar a la descrita en el trabajo de Fujimoto¹⁶⁴, con predominio de tumores de

grado 1 (47 %, 34 % y 18 % para grados 1, 2 y 3, respectivamente). El grado de diferenciación es un factor pronóstico respecto a la supervivencia en el CE, aunque es difícil establecer si actúa como una variable independiente. En nuestro estudio constituye una variable pronóstica independiente para ambas supervivencias. Varios estudios también han descrito una asociación pronóstica del grado de diferenciación, como la serie de Kitchener¹⁶⁵. En un estudio de 276 CE¹⁶⁶, las variables estadísticamente significativas que afectaron la SLE y SG fueron la edad, tipo histológico, invasión miometrial, estadio FIGO, grados tumoral e ILV. En el modelo multivariante, los predictores de recurrencia tumoral incluyeron el estadio avanzado ([HR] 4,90) y el grado tumoral (G2 con HR 4,79 y G3 con HR 7,56). Las mismas variables también se asociaron con un riesgo significativamente mayor de mortalidad relacionada con el tumor. Recientemente, un estudio de 521 CEE en estadio I ha mostrado que sólo la invasión miometrial y el grado histológico fueron factores pronósticos independientes para la recaída en estadio IA y IB respectivamente¹⁶⁷.

Otro de los factores pronósticos más importante en el CE según numerosos estudios es el estadio de la FIGO, ya que en la propia estadificación se incluyen otras variables pronósticas que influyen en la supervivencia del CE, como son la infiltración miometrial, la afectación del estroma cervical o la presencia de metástasis ganglionares. La ausencia de significación estadística respecto a la SG de otras variables en nuestra serie (invasión miometrial, estadio e invasión linfovascular) probablemente sea debida al reducido tamaño muestral.

6.1.2. Variables génicas

En base a la literatura existente, se seleccionaron 76 genes relacionados con los mecanismos moleculares implicados en el CEE, especialmente enfocados hacia los procesos del ciclo celular, la TEM y la angiogénesis.

El ciclo celular es un proceso biológico rigurosamente coordinado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y a su división. La carcinogénesis suele ser consecuencia de alteraciones en los genes implicados en el control del ciclo celular y la reparación de daños en el ADN. Los genes relacionados con este proceso codifican distintas ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK), cuya función consiste en regular el ciclo positivamente y fosforilar otras proteínas diana para desencadenar procesos celulares relacionados con la proliferación.

Respecto a los genes que intervienen en la TEM, se han incluido la mayoría de marcadores clásicos (*SNAIL*, *ZEB*, *TWIST*, cadherinas, etc...), de los que se dispone de una amplia información, así como otros genes que podrían modular este proceso a través de distintos mecanismos y vías de regulación. Las células tumorales con un fenotipo mesenquimal muestran una mayor capacidad migratoria, que les facilita la invasión en los tejidos adyacentes, así como intravasación vascular, culminando en el proceso metastásico.

La angiogénesis es un proceso fundamental para la invasión del cáncer o desarrollar metástasis. Las células tumorales pueden desprenderse del tumor y entrar en un vaso sanguíneo o linfático y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis. Distintas familias de factores de crecimiento, tales como FGF, VEGF y FLT, favorecen la proliferación capilar intratumoral, que permite proveer los nutrientes necesarios para la progresión tumoral.

En nuestro estudio encontramos niveles de correlación entre genes relativamente altos (cerca de 1). Las correlaciones más altas, con un valor superior a 0,85, las encontramos entre *PDGFR β* y *AKT2* (0,86), *CTNND1* (0,94) e *ILK* (0,88). También se observaron correlaciones superiores a 0,85 en el caso de *CTNND1* con *ILK* (0,87) y con *CXCL12* (0,86).

La existencia de correlaciones se explica porque la selección de genes que hemos realizado ha seleccionado distintos factores que intervienen en procesos comunes como son la proliferación, la TEM, la migración y la angiogénesis (*AKT*, *CTNND1*, *CXCL12*, *ILK* y *PDGFR β*). A continuación, comentaremos brevemente la función de cada uno de ellos para explicar cómo contribuyen a la progresión tumoral y el papel que ejercen en el CE.

El gen de *AKT* interviene en la regulación de la angiogénesis, proliferación y supervivencia celular, mediante la inhibición de los procesos apoptóticos¹⁶⁸. La familia de las proteínas que codifica el gen está constituida por tres isoformas (*AKT1*, *AKT2*, y *AKT3*), y son las principales dianas de los receptores tirosina quinasa que intervienen en la vía de *PI3K*¹⁶⁹. No obstante, las mutaciones de *AKT* son raras en el CE (1 % de los CE), lo que sugiere la activación de otras proteínas en puntos anteriores de esta vía¹⁷⁰.

La δ -catenina1 (*CTNND1*) es un gen que codifica un miembro de la familia de proteínas «arnadillo», que interviene en la adhesión celular. Las alteraciones de *CTNND1* son frecuentes en distintos tumores¹⁷¹ y la pérdida de su expresión se ha asociado con un mal pronóstico¹⁷². Varios estudios^{171,173} han analizado su expresión en el CE, demostrando la asociación de la expresión reducida de la δ -catenina con la E-cadherina.

El factor derivado de células estromales 1 (SDF1), también conocido como quimioquina 12 (*CXCL12*), es una citocina que está regulada por los estrógenos¹⁷⁴. Las quimioquinas desempeñan un papel importante en muchos procesos biológicos relacionados con la inflamación, la angiogénesis y el cáncer¹⁷⁵. La expresión de *CXCL12* se asocia con características clinicopatológicas agresivas asociadas a mal pronóstico en el CE¹²³.

La quinasa relacionada con la integrina (ILK) es una proteína que se ha asociado con la migración, proliferación y adhesión celular. Mediante la transducción de señales con proteínas de la matriz extracelular¹⁷⁶, ILK facilita el desarrollo de metástasis a través de la inducción de la TEM¹⁷⁷ al inducir la expresión de Snail¹⁷⁸ y otros represores de la E-cadherina¹⁷⁹.

ILK también interviene en la regulación del ciclo celular, a través de la proteólisis de la ciclina D1 y la activación del factor de transcripción AP1¹⁸⁰. Además, la localización de

ILK en el centrosoma se ha asociado a un papel regulador directo de la organización del huso mitótico¹⁸¹. ILK se ha descrito típicamente en los CE de tipo 2, asociado a aneuploidía¹⁸⁴ y a un curso biológico más agresivo. Además, *ILK* ejerce un papel regulador directo sobre la E-cadherina¹⁷⁸.

El receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGFR β) es una proteína tirosina quinasa que se encuentra en la membrana celular. Su unión al factor de crecimiento derivado de plaquetas desencadena eventos importantes en la célula, como son la proliferación y supervivencia celular. También promueve el reclutamiento y maduración de los pericitos necesarios para la proliferación vascular¹⁸².

Algunos de estos genes tienen en común un mecanismo regulador por la hipoxia¹⁸³, a través de la interacción de *HIF1*, su principal mediador. No obstante, en nuestro modelo este gen no ha entrado a formar parte de los modelos, ni hemos observado niveles de correlación significativos con los factores descritos anteriormente. Este hallazgo es indicativo de que podrían existir otros mecanismos más relevantes en la patogenia del CEE, y que la hipoxia actuaría como un evento secundario en la progresión tumoral del CEE. La relación de HIF1 con los principales mecanismos de progresión en el CE, así como sus reguladores, se muestra en la Figura 12.

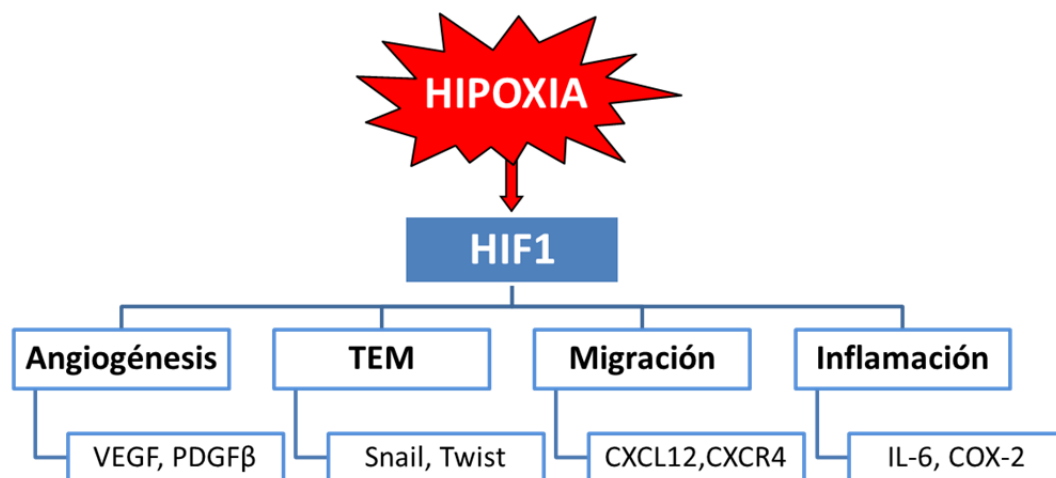


Figura 12. Representación de factores y procesos que interrelacionan algunos de los genes analizados en nuestro trabajo. Adaptado de Calcagno et al¹⁸³

6.2. Aspectos metodológicos

6.2.1. Extracción y amplificación mediante RT-qPCR

El análisis de expresión de ARN evaluado por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) ha sido un método clave en la investigación genómica y de biomarcadores moleculares^{185,186}. Las tecnologías basadas en

qPCR han evolucionado rápidamente, desde la determinación de un único gen hasta los estudios multigénicos gran escala¹⁸⁷. Además, cada vez existe mayor conocimiento a nivel molecular que demuestra que los perfiles de expresión o las firmas génicas constituyen una herramienta clave en la clasificación de los tumores en subtipos moleculares, incluso con relevancia pronóstica, y que no pueden ser identificados mediante los factores clínico-patológicos tradicionales¹⁸⁸.

Sin embargo, todavía no se ha conseguido trasladar estos avances moleculares a la práctica clínica rutinaria. Esto puede ser debido a diferentes factores que afectan a distintas etapas del procedimiento. Los estudios de cribado pueden requerir la realización de múltiples determinaciones a un volumen considerable de pacientes, lo que supone un gran coste económico¹⁸⁹. La dificultad para la recuperación de las muestras de archivo, la fragmentación del ARN durante la fijación, la calidad de los cebadores y el tamaño de los amplicones constituyen un ejemplo de los factores limitantes para la determinación de estas pruebas.

Inicialmente los estudios con microarrays y RT-qPCR se realizaban a partir de tejido tumoral obtenido en fresco. Aunque las muestras de tejido en fresco son el material de partida idóneo para la realización de estos estudios, su disponibilidad está generalmente limitada¹⁹⁰, por lo que es difícil recopilarlas a gran escala. Además, requieren un procesamiento específico y no todos los centros disponen del equipamiento necesario para su almacenamiento. Cabe destacar que en la mayoría de los casos sólo se obtienen pequeños fragmentos de tejido, ya que la práctica totalidad de la muestra se utiliza con fines diagnósticos y se somete a un procedimiento rutinario de fijación en formol e inclusión en parafina^{191,192}.

Una de las ventajas de las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina es que éstas son estables a temperatura ambiente y fácilmente almacenables a largo plazo¹⁹³, permitiendo una accesibilidad a la recopilación de dicho material de manera cómoda y simple. Además, el requerimiento de las muestras para posteriores estudios en el seguimiento clínico de los pacientes a largo plazo, hace que el almacenamiento en estos archivos sea particularmente útil para la determinación de biomarcadores novedosos que puedan repercutir en el manejo terapéutico del paciente o en el ámbito de la investigación.

Aunque los métodos de aislamiento de ARN adaptados a muestras *FFPE* están ampliamente documentados¹⁹⁴, en un estudio¹⁸⁷ se observó una diferencia significativa entre los métodos de aislamiento basados en columnas (Qiagen), que permitió la recuperación de 3,25 veces más cantidad de ARN y mostró una mayor integridad del mismo. El tiempo de almacenamiento de los bloques de tejido utilizados en este estudio oscilaba entre 3 y 6 años. Aunque se observó una alta degradación en la mayoría de las muestras, el método de aislamiento de ARN podía verse afectado en distinto grado, siendo mayor en las muestras más antiguas, con fragmentos de ARN por debajo de 200 nucleótidos. Este hallazgo suele observarse en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina tras 10-20 años de almacenamiento¹⁹⁵, y es un hecho ampliamente descrito en diferentes estudios¹⁹⁶.

Un esquema del proceso de análisis de expresión génica con tejido parafinado se representa de manera esquemática en la Figura 13.

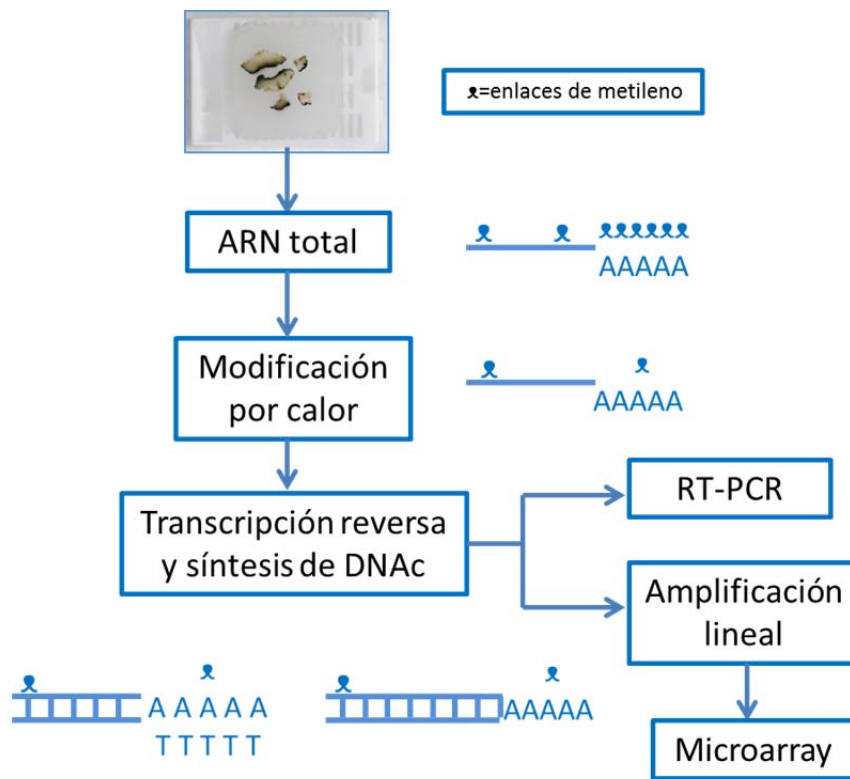


Figura 13. Pasos generales del proceso de análisis de expresión génica con tejido *FFPE*. El ARN total se extrae por tratamiento con proteinasa K. El calor elimina los enlaces de metileno y el ARNm se transcribe de forma inversa a ADNc utilizando cebadores específicos de genes. El ADNc se utiliza para la RT-PCR en tiempo real o para análisis de microarrays después de la amplificación lineal del ARNm. Adaptado de Paik et al.¹⁵⁵

La RT-qPCR es un método robusto al utilizar fragmentos de ARN de tamaño discreto, incluso a pesar de la degradación parcial del ARN^{155,197}. La cuantificación de los niveles de expresión de genes individuales utilizando RT-qPCR en tiempo real permite la detección masiva de hasta casi 1.000 genes, con la extracción de ARN de secciones de bloques parafinados de 30 µm de espesor.

El proceso de normalización permite compensar las diferencias del material entre muestras¹⁸⁸ y resulta esencial para este tipo de estudios¹⁹⁸. Varios estudios han descrito que los cambios observados en los valores de Cq inducidos por la fragmentación del ARN pueden ser parcialmente compensados con una normalización adecuada¹⁹⁷. La elección de los genes para el proceso de normalización es fundamental para poder comparar los distintos niveles de expresión de cada ARNm¹⁹⁹. Habitualmente, se selecciona un conjunto cuya expresión se mantiene constante en todas las muestras, para garantizar que las diferencias de expresión entre las distintas muestras no se deben a diferencias en el

material de partida, como la cantidad, la conservación de la muestra por el método de purificación, o por el método de extracción.

En otro estudio, elaborado por Cronin y colaboradores¹⁹³, se examinó sistemáticamente la calidad del ARN extraído de 92 muestras fijadas en formol e incluidas en parafina de cáncer de mama tomadas en distintos tiempos, y se encontró una disminución de la señal identificada por RT-PCR de aproximadamente un 90 % entre las muestras de 2001 con respecto a las de 1985. Por tanto, parece confirmado que el ARN continúa degradándose según avanza el tiempo de almacenamiento en el interior del bloque de parafina. Ante la posibilidad de una disminución de la sensibilidad para identificar las señales por RT-PCR, este estudio demostró que mediante un proceso de normalización, utilizando un conjunto de seis genes de referencia, es posible corregir este sesgo, compensando la pérdida de señal.

No se han llevado a cabo estudios que hayan cuantificado de forma sistemática el efecto de los ajustes del flujo de trabajo de la RT-qPCR sobre la sensibilidad final. Muchos estudios relacionados con la validación de técnicas de expresión génica en muestras parafinadas se enfrentan con una sensibilidad comprometida en la RT-qPCR, que se desplaza hacia valores Cq altos, con una alta frecuencia de pérdida de datos¹⁸⁸. El aumento de la calidad del ARN sólo mejora la sensibilidad en la qPCR de forma limitada, y la transcripción inversa específica del gen y la preamplificación pueden ayudar a aumentar la sensibilidad en estudios de expresión de ARN en material parafinado.

En un estudio previo del Hospital La Paz¹⁹⁷, se compararon los datos brutos de 30 muestras en fresco y parafinadas por RT-qPCR para comparar las Cqs en 95 genes. A pesar del desplazamiento Cq observado, la correlación en los valores de Cq entre las muestras pareadas fue muy alta. Sin embargo, estos coeficientes tan altos simplemente parecían indicar que el nivel relativo de expresión de cada gen se mantenía en ambos materiales. Es decir, genes con baja Cq de muestras en fresco (alto nivel de expresión) también tenían bajas Cqs en las correspondientes muestras parafinadas, y viceversa. En este trabajo se demostró que la RT-qPCR puede ser aplicada en muestras parafinadas, y que aunque el ARN derivado estas muestras esté degradado, el proceso de normalización es capaz de compensar, hasta cierto punto, los efectos de dicha degradación.

6.2.2. Estudio de Arrays de baja densidad con sondas Taqman

En esta tesis se ha utilizado un estudio de arrays de baja densidad con sondas Taqman²⁰⁰, que constituye un método de rendimiento medio para la RT-PCR en tiempo real, que utiliza tarjetas microfluídicas capaces de analizar simultáneamente los niveles de expresión de ARN de hasta 384 genes en una sola tarjeta.

Los experimentos que utilizan las tarjetas microfluídicas Taqman se diferencian de los ensayos convencionales de RT-PCR en tiempo real en dos aspectos. En primer lugar, y dependiendo del experimento, cada muestra puede analizarse en una tarjeta de forma separada. El uso de un calibrador de una tarjeta separada puede introducir un sesgo o aumentar la variabilidad, porque puede ser procesado bajo diferentes condiciones en el

ciclo térmico. En segundo lugar, ya que se pueden analizar hasta 384 genes por tarjeta, permite una selección más amplia de controles endógenos o genes de referencia. En el caso concreto de nuestro trabajo, se incluyeron 76 genes y 8 de referencia.

Sin embargo, esta técnica no está exenta de inconvenientes, principalmente derivados de la variabilidad en los resultados que se pueden obtener, por lo que se necesita un análisis de datos potente para su correcta interpretación²⁰¹.

6.2.3. Análisis estadístico

Para la generación de los modelos de supervivencia se realizó un análisis mediante regresión de Cox con cada una de las variables y, adicionalmente, se emplearon los métodos de regresión penalizada de *Lasso* y *Boosting*, con el fin de aumentar la precisión del modelo y reducir la varianza. El método *Lasso* añade una penalización *Lambda* o «factor de disminución» sobre la suma de los coeficientes que permite imponer más o menos penalización y que, a su vez, se optimiza para cada modelo¹⁵⁸. El método *de boosting* es un método menos restrictivo, que se aplica para la generación de modelos mediante un algoritmo que permite aumentar la precisión en la predicción cuando el número de variables a analizar es elevado respecto al número de muestras¹⁵⁷. Existen otros métodos de regresión lineal múltiple alternativos para el estudio de variables correlacionadas y de alta dimensionalidad, tales como el análisis de componentes principales²⁰², la regresión de mínimos cuadrados parciales²⁰³ y la regresión contraída²⁰⁴ (*ridge regression*), que fueron descartados al no permitir la selección de variables que realiza *LASSO*, evitando la colinealidad y aumentando el poder de predicción del modelo.

6.3. Biomarcadores identificados en el análisis univariante

6.3.1. EGFR

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) actúa como un potente mitógeno en varios tipos de tumores, incluyendo el CE. Su acción ha sido relacionada con numerosos procesos de importancia en el cáncer, como la proliferación, la migración y la invasión, la diferenciación y la angiogénesis²⁰⁵. Además se piensa que tiene un papel activo en la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis^{206,207}. Su receptor, EGFR, está altamente expresado en el CE²⁰⁸, y su fosforilación estimula varias vías de transducción de señales, incluida la vía de MAP²⁰⁹.

Un estudio ha descrito la expresión de EGFR en el 43-67 % de los casos de CE, asociados a una notable disminución en la SLE y SG, particularmente en los CE de tipo II más agresivos²¹⁰. Sin embargo, existen muchas otras publicaciones en la literatura con datos contradictorios, con estudios de resultados similares al anterior, que afirman que EGFR se asocia con CENE²¹¹, mientras que otros han reportado una asociación con el

tipo endometrioides^{212,213} e incluso muchos otros que han reportado que no existe una asociación²¹⁴ con el tipo histológico.

Además del papel de EGFR en la proliferación e invasión tumoral, varios autores han informado que la señalización anormal de los receptores de tirosina quinasas juega un papel crucial en la regulación de la transición de la TEM, aunque este proceso todavía se considera que debe ser mejor estudiado. Existe un estudio²⁰⁶ que mostró una correlación positiva en el CE entre la expresión de EGFR y Snail, y otro en el que se describe que EGFR activa la expresión del gen *TWIST* mediante la unión de STAT3 a su promotor²⁰⁷. Además, la regulación transcripcional inducida de Snail por EGF sería necesaria para la regulación negativa de la E-cadherina²¹⁵. La vía de señalización de Ras-Raf también activa la cascada de MAPK y posteriormente a Snail, que regula negativamente la transcripción de la E-cadherina²¹⁶.

6.3.2. Plk1 y Plk2

La quinasa-1 tipo polo (Plk1) es una serina-treonina kinasa que regula la progresión del ciclo celular, la diferenciación y la supervivencia²¹⁷⁻²¹⁸. Plk1 facilita el inicio de la mitosis en la célula y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica²¹⁹, así como la regulación de los puntos de control en respuesta a los daños en el ADN²²⁰.

Las distintas funciones y estructuras de la familia de quinasas Plk se representan en la Figura 14.

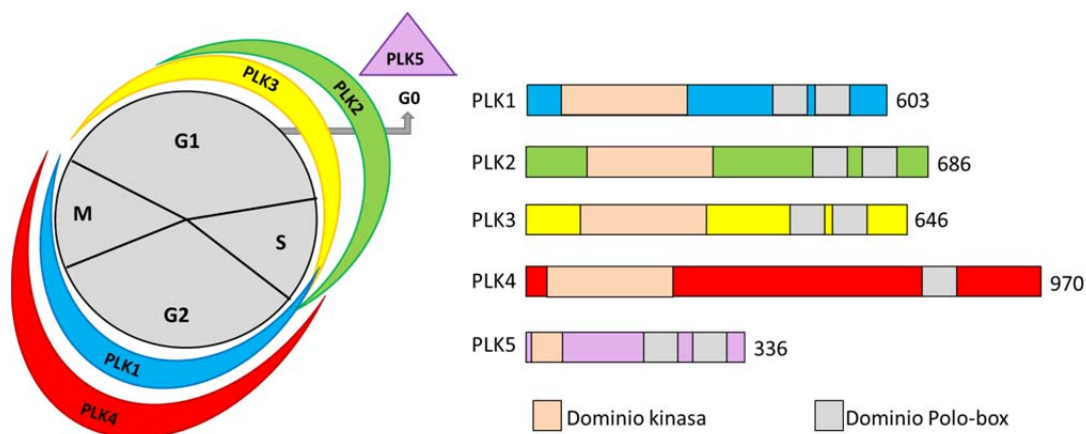


Figura 14. Estructura y patrones de expresión de las proteínas Plk. A la izquierda, una representación de la participación de las proteínas Plk en el ciclo celular. Los niveles de las proteínas Plk1 y Plk4 aumentan notablemente en la fase M, mientras que Plk3 y Plk2 aumentan en la fase G1 y la fase S, respectivamente. Plk5 se acumula en las células senescentes, pero no en las células en proliferación. A la derecha, se muestran las características estructurales comunes de las proteínas Plk, incluyendo el dominio kinasa N-terminal y el dominio Polo-box C-terminal. Adaptado de Yim et al²²⁵

Plk1 juega un papel significativo en la transformación cancerígena, debido a que produce una división celular anómala, sin una adecuada alineación cromosómica, favoreciendo la aneuploidía, que se considera una de las marcas distintivas del cáncer²²⁶. Los datos existentes sugieren que la sobreexpresión de Plk1 produce una alteración del eje RB-p53-p21, promoviendo la inestabilidad genómica. La función de p53 y de Plk1 está estrechamente relacionada: Plk1 puede unirse a p53 y regular negativamente su función²²⁷. Dado que p53 es un regulador crítico del control de daños en el ADN y del ciclo celular, la sobreexpresión de Plk1 constituye un potencial mecanismo en la carcinogénesis.

La depleción o inhibición de Plk1 produce la detención del ciclo en la fase G2 / M por la disfunción de la alineación del centrosoma²²⁸, promoviendo la apoptosis^{229,230}.

El equipo de Takai realizó un estudio²³⁴ en 40 muestras endometriales (20 CE y 20 muestras sin lesiones) con IHQ y RT-PCR. Dicho estudio reveló que en los especímenes tumorales, Plk se expresaba a un nivel mucho más alto cuanto mayor era el grado. Además, se observó que la mayoría de células positivas eran las que se localizaban en el frente invasivo del tumor o las que habían invadido el miometrio. Otro hallazgo significativo fue que las dos pacientes que murieron por enfermedad en este estudio presentaron los porcentajes más altos de células positivas frente a Plk por IHQ. Estos hallazgos no solo sugieren una asociación con la actividad proliferativa, sino que plantea la posibilidad de que Plk pueda participar en la mioinvasión del CE y la existencia de una correlación significativa entre los porcentajes de células positivas de Plk y el grado de malignidad del CE. Otra investigación²²⁵ analizó las correlaciones entre la expresión de Plk1 y el grado tumoral en cáncer de colon, ovario y endometrio con hallazgos similares.

Por tanto, podemos concluir de los datos obtenidos de estos estudios que los tumores con una expresión alta de Plk1 muestran una peor tasa de supervivencia^{233,235}, lo que sugiere que la sobreexpresión de Plk1 está estrechamente ligada con la agresividad biológica del cáncer, y que apoya los resultados de nuestro modelo, en el que Plk1 se comporta como un factor de riesgo que afecta a la SG de las pacientes de manera significativa.

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio en el que se compararon los niveles de expresión de Plk1 en 25 tipos tumorales, cuyos resultados fueron que la expresión elevada de Plk1 se asocia con peor SLE en 7 de las patologías estudiadas, y peor SG en 10, incluyendo en este último caso al CE²³⁶.

Por otra parte, las funciones de Plk2 siguen siendo objeto de estudio, ya que existen escasos datos en la literatura sobre su función en la carcinogénesis, y se han centrado fundamentalmente en el papel de Plk1. No obstante, varios estudios sugieren que Plk2 también interviene en el control del ciclo celular para asegurar la supervivencia de la célula^{221,222}. Además, Plk2 es esencial para el desarrollo e interviene en procesos de diferenciación en el sistema nervioso^{223,224}.

6.4. Perfiles de expresión con valor pronóstico

Los dos perfiles de supervivencia identificados en este trabajo tienen valor pronóstico en nuestra casuística y son capaces de estratificar a las pacientes en dos grupos de alto y bajo riesgo. El modelo de SLE está compuesto únicamente por 3 genes, 2 considerados como factores de riesgo (*PIK3CG* y *PLK2*) y otro (*CDH2*) como factor protector. El modelo de SG está compuesto por 10 genes, de los cuales 7 actúan como factores de riesgo (*EGFR*, *ESR1*, *FGFR2*, *PIK3CG*, *PLK1*, *PLK2* y *RPS6KB2*), y los 3 restantes (*CDH2*, *FLT44* y *VEGF*), como factores protectores.

Los tres genes que aparecen en el análisis univariante relacionados con la supervivencia (*PLK2* para SLE y *PLK1* y *EGFR* para SG) también forman parte de los perfiles identificados en el análisis multivariante. En el perfil de SG, el gen *EGFR* es el que presenta mayor impacto, junto con *PLK1*, de manera estadísticamente significativa. Ambos genes actúan como factores de riesgo en el conjunto de los genes que conforman el modelo y se han comentado ampliamente en el apartado anterior. Los genes *CDH2*, *PIK3CG* y *PLK2* son comunes en los dos modelos de SG y SLE, y mantienen el mismo signo de HR, lo que sugiere que contribuyen de la misma manera en la supervivencia de las pacientes.

Es importante recalcar que la influencia positiva o negativa que tiene cada gen dentro del perfil está modificada por los genes que se analizan en conjunto y conforman dicho perfil, y que su efecto a nivel individual no tiene por qué ser el mismo. Este hecho se manifiesta en nuestro modelo en el papel que ejerce *ESR1* como factor de riesgo, así como el efecto protector que constituyen dos genes que intervienen en la angiogénesis (*FLT44* y *VEGF*) y cuya presencia se ha asociado a un peor pronóstico en otros estudios. Asimismo, la función protectora de *CDH2*, que codifica la N-cadherina y que está considerada como un marcador de fenotipo mesenquimal, parece contradictoria en el contexto de otros marcadores que favorecen la TEM como factores de riesgo. La reversión de la TEM en TME es una de las hipótesis que se ha planteado en varias publicaciones que analizan diversos factores implicados en este complejo proceso²³⁷.

La precisión de los perfiles fue evaluada a diferentes tiempos mediante curvas ROC. Tanto el perfil de SLE y SG mostraron muy buena capacidad predictiva a lo largo del tiempo, con valores de AUC muy elevados, superiores a 0,9. No obstante, el análisis de supervivencia de este estudio debe ser considerado con cautela, debido al limitado tamaño muestral.

Las pacientes con CE se estratifican como de alto o bajo riesgo de enfermedad extrauterina según la estadificación quirúrgica. La importancia de identificar subgrupos de fenotipo agresivo, incluso en estadios precoces, radica en que están asociados con un riesgo de recaída del 15 al 20 % y un índice reducido de curación quirúrgica⁵⁴.

Con el objetivo de distinguir precisamente estos subgrupos de riesgo, un estudio²³⁸ de 75 CE de riesgo intermedio, de los cuales 13 presentaron recaída, pretendía identificar los genes con mayor riesgo de recaída basados en un sistema de puntuación. En este estudio no se obtuvo una firma de genes relacionada con SLE, pero cuando los datos de

expresión génica se utilizaron para crear dicha puntuación, las mujeres con CE en etapas precoces con riesgo intermedio podían separarse en dos subgrupos para su riesgo de recaída.

Posteriormente, el equipo de Salvensen, en colaboración con otros centros investigadores, desarrolló a partir de los datos de publicaciones anteriores un modelo²³⁹, denominado ECARS (de las siglas *Endometrial CArcinoma Recurrence Score*) basado en la firma de expresión de 29 genes que identificaba un subgrupo agresivo de pacientes con CE con activación de la vía de *PI3K*. Este sistema de puntuación se obtenía restando la suma de los valores extremos de expresión de los genes obtenidos del grupo de peor pronóstico en la cohorte de investigación primaria. Dicho estudio se validó en cuatro series independientes de pacientes, incluyendo un total de 613 casos. La importancia de este análisis radicaba en que conseguía identificar incluso dentro de los subgrupos de CEE de bajo grado, tumores que presentaron un mal pronóstico. En los casos con diseminación metastásica, se comprobó una asociación significativa con la activación de la vía de *PI3K*, marcadores de la TEM e invasión vascular. En nuestro trabajo se han obtenido resultados similares (*PIK3CG*, *EGFR*, *FGFR2* y *RPS6KB2*), con significación estadística en el análisis univariante para *EGFR*.

En otro estudio reciente²⁴⁰, cuyo objetivo fue elaborar un modelo predictivo para identificar los grupos de riesgo en 190 pacientes con CEE del TCGA, se utilizaron tres estrategias basadas en el análisis de: 1) estado mutacional para cada gen; 2) número de mutaciones somáticas; 3) frecuencias de variantes alélicas para cada mutación somática de cada gen. La segunda estrategia generó un perfil de 411 GED, que mediante varios procesos de selección estadística, se redujo a una firma de 35 genes. Esta estrategia presenta una gran similitud con el modelo empleado en esta tesis, aunque tiene como desventajas una mayor cantidad de genes a analizar y un AUC inferior a nuestro modelo. Por otro lado, la última estrategia generó un modelo de predicción superior, con un AUC del 91 %. El análisis estadístico de los resultados obtenidos de la tercera estrategia mediante los métodos de *LASSO* y *Ridge* identificó un perfil de 53 genes, sin que la adición de los datos clínicos mejorase el modelo de manera significativa. Respecto a esta estrategia, aunque la AUC fue buena, el modelo tenía un poder predictivo limitado y exigía de métodos de secuenciación masiva para su estudio, por lo que lo hace escasamente utilizable en la práctica rutinaria.

La hipótesis que plantea otra publicación reciente²⁴¹ es que la expresión de genes involucrados en la patogenia del CENE podrían actuar como un factor predictivo en pacientes con CEE de mal pronóstico. Para explorar esta hipótesis, se realizó un metanálisis de 12 estudios de microarrays, en el que se identificaron 2.053 genes expresados diferencialmente entre CEE y CENE. De estos genes, tras validarse con los datos del TCGA se obtuvo un perfil constituido por 1.253 genes. De estos 1.253 genes, 601 aparecían sobreexpresados en CEE en comparación con los CENE. Como era de esperar, los genes más significativamente regulados positivamente incluyeron genes que respondían a estrógenos. Por el contrario, hubo 652 genes con mayor expresión en los CENE en comparación con los CEE, principalmente involucrados en el ciclo celular. Posteriormente, se seleccionó finalmente un conjunto de 9 genes que se asociaban con

mal pronóstico en el CEE (*PRRG1*, *C4BPA*, *PDLIM1*, *FBP1*, *PPP2R3A*, *NLRC3*, *TRIM46*, *ST6GALNAC1* y *EPHB2*). La expresión de este conjunto de 9 genes se utilizó para construir un índice pronóstico para cada paciente, el cual se asociaba con una supervivencia disminuida. Esta asociación siguió siendo significativa después de un análisis multivariante, ajustándose a covariables clínicas, como estadio y grado. Sin embargo, la diferencia en la supervivencia específica entre los grupos de riesgo alto y bajo no fue significativa en una cohorte de validación más pequeña (92 pacientes) de una base de datos del TCGA.

Como hemos comentado anteriormente, el papel que ejerce *ESR1* en nuestro modelo como factor de riesgo debe ser examinado con precaución, puesto que, como hemos comentado antes, su efecto individual puede diferir del papel que ejerce en el modelo en combinación con el resto de genes.

En un estudio que identificó una firma de 19 genes²⁴², los expresados en los CEE de bajo grado estaban relacionados con procesos que intervienen en el metabolismo regulado por estrógenos, y podrían comportarse como biomarcadores asociados a buen pronóstico. Otros estudios anteriores que analizaron perfiles de expresión^{184,243,244} obtuvieron resultados similares.

Por otro lado, una línea de investigación llevó a cabo un estudio con el objetivo de comprobar si los CE con expresión negativa de receptores de estrógenos α (RE- α) se asociaban con un fenotipo clinicopatológico agresivo²⁴⁵. Mientras que la expresión de *ESR1* se asoció con la supervivencia, la negatividad de RE lo hizo con genes implicados en las vías de *Wnt*, *Sonic Hedgehog* y *TGF- β* , lo que indica una probable relación con la TEM. Este trabajo confirmaría el papel de RE- α como un biomarcador de buen pronóstico, y que la TEM es un proceso importante en los CE con RE negativos.

6.4.1. Análisis y perfiles de expresión génica relacionados con la proliferación y el ciclo celular

En nuestros modelos predictivos aparecen varios genes relacionados con el ciclo celular, como *PLK1* y *PLK2*, de los que ya hemos hablado previamente y que ponen de manifiesto su importancia pronóstica en la carcinogénesis del CEE, con resultados significativos en SG y SLE respectivamente. Otros genes incluidos en nuestro modelo de SG tienen relación con la proliferación celular, como son *FGFR2* y *RPS6KB2*.

FGFR2 codifica un receptor tirosina quinasa implicado en la proliferación celular y está mutado en el 10-12 % de los CE. Existen estudios que han demostrado que mutaciones de *FGFR2* se correlacionan con el estadio, tipo histológico y grado tumoral en el CE⁹⁷, así como a una menor SLE y SG¹⁴⁶.

RPS6KB2 es un gen que codifica un miembro de la familia de serina / treonina quinasas RSK (*ribosomal S6 kinase*). Esta quinasa fosforila la proteína ribosomal S6, que conduce a un aumento en la síntesis de proteínas y la proliferación celular. La quinasa S6K2 se

considera un regulador de la señalización mTOR, aunque su contribución a la carcinogénesis sigue estando poco esclarecida^{246,247}.

Estos genes forman parte de nuestro modelo de SG, pero no han alcanzado significación estadística en el análisis univariante. No obstante, y debido a la presencia de varios genes implicados en la proliferación y ciclo celular en nuestro modelo, hemos revisado la literatura con el objetivo de analizar el papel de genes implicados en estos procesos en el CEE.

Un estudio ²⁴⁸ de 35 CE reveló 3 grupos diferentes de tumores, con comportamientos clínicos específicos, siendo uno de ellos caracterizado por la sobreexpresión de *CCNE2*.

Un estudio reciente de perfiles de expresión ²⁴⁹ en 328 muestras de pacientes con CE puso de manifiesto la sobreexpresión de moléculas relacionadas con el ciclo celular, como *CDK1* y *CCNA2* en estos pacientes. En una publicación anterior²⁵⁰ ya se observó también que la sobreexpresión de *CDK1* estaba estrechamente asociada con el desarrollo del CEE y se consideró como un indicador molecular pronóstico en el CE. En este estudio, que contaba con 41 CEE confinados en cavidad uterina, 12 de ellos presentaron metástasis en ganglios linfáticos. Entre los genes sobreexpresados, destacaron dos genes que intervienen en el control del ciclo celular, *CDC2* y *MAD2L1*, cuya asociación con metástasis en ganglios linfáticos estaba ya descrita previamente²⁵¹. El papel que ejercen otras ciclinas, como *CDK4/6*, se ha correlacionado significativamente con el pronóstico en una serie de 109 CEE, mostrando una SLE menor²⁵².

6.4.2. Análisis y perfiles de expresión génica y proteica relacionados con la TEM

Como ya hemos comentado, la característica molecular básica de la TEM es la supresión de la expresión de la E-cadherina, que interviene tanto en la adhesión celular como en la supresión tumoral, inhibiendo los procesos de invasión y metástasis. El aumento de la expresión de los represores de la transcripción de E-cadherina (Twist, Snail y Slug) conlleva la disminución de su expresión, y se ha relacionado con la invasión miometrial, alto grado histológico, estadio avanzado y presencia de invasión linfovascular^{253,254}.

En nuestro estudio, aparecen algunos genes relacionados directa o indirectamente con el proceso de TEM. Concretamente, *CDH2* aparece en ambos perfiles de SLE y SG.

Al igual que con *ESR1*, el papel de *CDH2* como factor protector puede no ser representativo a nivel individual. Además, en la introducción ya comentamos que el proceso de la TEM es reversible, y que los tumores una vez han invadido el miometrio, podrían volver a expresar un fenotipo epitelial. Una publicación reciente sobre la migración tumoral²⁵⁵ ha relacionado el cambio de expresión de la N-cadherina facilitado por la acción de FGFR, que es otro de los genes de nuestro modelo.

Los datos de un ensayo²⁵⁶ que evaluó la relevancia clínica de la expresión de distintas cateninas, cadherinas y reguladores del ciclo celular en un grupo de 42 CE en estadio IV o en recaída mostraron correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión de E-cadherina con la del resto de cateninas (alfa, beta, delta y gamma). Las pacientes con

alta expresión de E-cadherina tenían una reducción del riesgo de progresión de la enfermedad. La expresión de N-cadherina no mostró relación pronóstica ni se asoció directamente con la de E-cadherina, aunque sí con la expresión de p120 y delta-catenina.

Un estudio²⁵⁷ demostró que la reducción de la expresión de E-cadherina mediante IHQ se relacionaba directamente con el grado tumoral y una mayor invasión miometrial. Además, la sobreexpresión de Snail y Slug se asoció con una expresión reducida de E-cadherina, con una intensidad mayor en el frente invasivo del tumor. Estos datos confirman observaciones previas que sugieren que la disociación de las células cancerosas debido a la disminución de la expresión de E-cadherina facilita la invasividad en el CE^{89,112}. En otro estudio en CEE²⁵⁸ se ha observado una correlación inversa entre la expresión de HIF1a y TWIST respecto a E-cadherina a medida que las lesiones presentaban factores clínico-patológicos más agresivos, tales como mayor grado, invasión miometrial profunda y metástasis a ganglios linfáticos. Sin embargo, un estudio previo²³⁷ que analizó la expresión de E-cadherina en 102 pacientes con CE concluye que la disminución de la expresión de esta proteína se asocia a tumores de alto grado pero, al contrario de lo descrito en otros estudios, se correlacionó con una disminución de la invasión miometrial^{112,259}. Este hallazgo podría estar relacionado con la disminución de la expresión de E-cadherina en la fase invasiva inicial, y posterior "re-expresión" tras la invasión.

Otro estudio²⁶⁰ sobre 156 muestras de CE quiso analizar la expresión de los genes relacionados con la TEM (Snail y Slug) para comprobar si existía una correlación con el fenotipo de célula stem, mediante el marcador CD133. Los resultados de este análisis fueron que Snail y Slug se correlacionaron entre sí y que la disminución de la expresión de Slug se asoció con una menor SG. La conclusión de este estudio fue que la expresión de Slug podría servir como un factor pronóstico en el CE. Por otro lado, en este estudio no se encontró una correlación entre la expresión de factores de la TEM CD113, un marcador de célula madre.

6.4.3. Análisis de perfiles de expresión génica relacionados con angiogénesis

La angiogénesis es un proceso importante que permite el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis^{261,262}. Los vasos asociados a tumores son estructuralmente y funcionalmente anormales, con un aumento de la permeabilidad y con un potencial para la proliferación²⁶³, facilitando la diseminación tumoral. Los factores angiogénicos con mayor influencia son los miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y sus receptores VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR/FLK1) y VEGFR3 (FLT4). VEGF-A y -B actúan principalmente a través de VEGFR1 y -R2, mientras que la acción de VEGF-C y -D es a través de VEGFR3.

En nuestro modelo de SG aparecen dos genes implicados en la angiogénesis, *FLT4* y *VEGF-A*, que actúan como factores protectores. *FLT4* es el gen que codifica el receptor de tirosina quinasa de VEGF C y D, y está implicado en la linfangiogénesis. *VEGF-A* se expresa en el endometrio normal, y ha sido objeto de varios estudios con distintos resultados respecto a su nivel de expresión en CE²⁶⁴.

Existen estudios que no han encontrado una asociación significativa entre la expresión de *VEGF* con factores clínico-patológicos pronósticos en el CE²⁶⁵. Sin embargo, otros estudios²⁶⁶ demostraron que la expresión de factores angiogénicos (*VEGF-A*, *VEGF-C* y *VEGF-D*) se asociaron con características histológicas agresivas, como la presencia de necrosis y estadio avanzado, mostrando además un efecto pronóstico independiente en el análisis de supervivencia multivariante. Este aumento de la regulación de los factores angiogénicos podría ser el resultado de fenómenos de hipoxia mediados por *HIF1A*²⁶⁷. Este trabajo apoyaría la hipótesis de que la angiogénesis podría contribuir en la progresión tumoral del CE. No obstante, en nuestro estudio, *HIF1* no ha salido significativo en el análisis univariante y no aparece en nuestro modelo de supervivencia, lo que sugiere la hipoxia, que es el regulador principal de los factores de angiogénesis citados anteriormente, no actuaría como principal desencadenante en nuestra serie de CEE.

Existen dos estudios relevantes en CE que utilizan perfiles de expresión con genes involucrados en la angiogénesis con fines pronósticos. Ambos han sido llevados a cabo por un mismo equipo noruego (Mannelqvist²⁶⁸ y Stefansson²⁶⁹) basados en la firma de 18 y 32 genes respectivamente. El primer estudio²⁶⁸ se analizaron los distintos patrones de expresión génica relacionados con la afectación vascular en 57 CE. Se identificó una firma relacionada con la invasión vascular compuesta de 18 genes que se asoció significativamente con la supervivencia y el fenotipo clínico-patológico. La afectación vascular también se relacionó con un conjunto de genes relacionados con la TEM, la respuesta al daño, las células endoteliales y la actividad del *VEGF*. Aunque en el análisis univariante esta firma de 18 genes se asoció con la supervivencia, presencia de necrosis, RE negativos y estadio avanzado, en el multivariante este perfil no alcanzó una importancia pronóstica independiente en comparación con los factores clínicos patológicos estándar. El otro estudio²⁶⁹ fue de carácter prospectivo, y reveló que un aumento de la proliferación vascular se asociaba con características agresivas del tumor y una menor supervivencia. Además, se identificó una firma de 32 genes que permitía separar los tumores según su proliferación vascular. Los tumores con mayor proliferación vascular se asociaban con tumores de alto grado y una supervivencia reducida en cohortes independientes. De los genes más importantes sobreexpresados, destacan *TPM1*, *PDGFB*, *SERPINH1* e *ITGB3*, cuya función consiste en la regulación de la proliferación vascular y la angiogénesis.

Tras la revisión de la literatura sobre perfiles de expresión y modelos de supervivencia en CEE, y en base a los resultados de nuestro trabajo, podemos concluir que los genes que intervienen en la proliferación y el ciclo celular tendrían un papel más activo en la carcinogénesis del CEE, y que la inclusión de estos genes en perfiles de expresión podría ayudar a clasificar CEE en estadios iniciales en grupos pronósticos. Al igual que ocurre en otro tipo de neoplasias (como en mama, por ejemplo), existen estudios de arrays de expresión génica que incluyen genes que intervienen en el ciclo celular y que ofrecen información pronóstica en carcinomas bien diferenciados, estableciendo el riesgo de recaída. Nuestro modelo incluye dos genes que intervienen en la proliferación y el ciclo celular (*EGFR* y *PLK1* respectivamente, con significación estadística en el modelo

univariante) y que ha permitido identificar dos subgrupos de riesgo respecto a SG en un modelo pronóstico estadísticamente significativo en los distintos tiempos de estudio.

Otros genes que intervienen en la proliferación celular y que están incluidos en el modelo de SG son *FGFR2*, *PIK3CG* y *RPS6KB*. Estos genes actúan como factores de riesgo en nuestro modelo, y aunque no hayan alcanzado la significación estadística, los datos publicados en la literatura están en concordancia con su asociación a un curso más agresivo del CEE.

Paradójicamente, *ESR1* ejerce también efecto de riesgo, a pesar de que en la literatura está considerado como un biomarcador de buen pronóstico. No obstante, tal y como comentamos, el papel de un gen de manera individual puede diferir al que efectúa como conjunto en el modelo. Asimismo, el efecto protector de dos genes relacionados con la angiogénesis (*FLT4* y *VEGF-A*) podría explicarse debido a que la hipoxia, el principal regulador de la angiogénesis, no constituye el mecanismo principal de la progresión tumoral en el CEE, frecuentemente carente de áreas de necrosis de manera significativa. Del mismo modo, el papel protector que ejerce *CDH2* en ambos modelos de SLE y SG debe ser tomado con cautela, teniendo en cuenta que el proceso de la TEM es un fenómeno reversible, en el que las células tumorales una vez han invadido el miometrio, volverían a expresar un fenotipo epitelial.

6.5. Limitaciones del estudio

Una de las dificultades metodológicas más importantes a la que se enfrentan los estudios de análisis de múltiples genes es la derivada por el tamaño muestral. La principal limitación para el análisis estadístico que presenta nuestro estudio es precisamente el tamaño de la muestra respecto a otras series descritas en la literatura ($N = 46$). Además, al tener un número elevado de variables génicas (76 genes), aumenta la probabilidad de «*overfitting*», es decir, la probabilidad de generar perfiles de expresión diferenciales obtenidos por azar cuando se analiza un gran número de potenciales factores predictivos o pronósticos entre un número limitado de eventos²⁷⁰. Otro aspecto a tener en cuenta es que debido al limitado tamaño muestral, los datos clínico-patológicos y genéticos incluidos para generar este modelo predictivo pueden no representar adecuadamente a los de la población general. Como aspecto llamativo en nuestra serie, se han documentado 17 fallecimientos, lo que supone una tasa de mortalidad del 36,9 %; si bien es cierto que en la revisión realizada de este estudio no consta si el fallecimiento es por causa tumoral o por otras causas. Esta cifra de mortalidad es elevada en comparación a otras series de carcinoma de endometrio. Además, cabe destacar que muchos de estos fallecimientos se han producido en enfermas con estadios precoces, lo que sugiere que probablemente no tengan relación directa con el proceso neoplásico. Así, de un total de 31 pacientes en estadio FIGO IA, se produjeron 10 fallecimientos, lo que constituye casi un tercio de estas pacientes; de 10 pacientes con infiltración mayor de la mitad de la pared miometrial (estadio FIGO IB), fallecieron 4, lo que supone el 40 % dentro de este subgrupo de pacientes. Por ello, consideramos que estos datos de mortalidad son poco

representativos de la historia natural del CEE, con tasas de supervivencia a 5 años en etapa IA y IB del 88 % y 75 %³².

A la hora de plantear estudios de perfiles de expresión en cáncer de endometrio, también es importante la homogeneidad de la muestra respecto a la población general, ya que un determinado subtipo histológico diferente conlleva un pronóstico distinto. Por ello, en nuestro estudio hemos seleccionado únicamente pacientes con CEE, sin incluir otros subtipos (serosos, células claras, carcinosarcomas, etc.) que se asocian a un peor pronóstico y a una supervivencia reducida.

Por todos estos motivos es imprescindible realizar una validación externa de los resultados obtenidos con cada perfil génico y demostrar así la reproducción en una serie de pacientes diferente a la que se utilizó para generar el modelo. Este paso es fundamental para que un perfil génico pueda ser utilizado en la clínica. Una alternativa, cuando esto no es posible, es la utilización técnicas de remuestreo de los casos de la serie para mejorar la capacidad predictiva del modelo, y aplicar metodologías estadísticas como la validación cruzada, como las aplicadas en este trabajo²⁷¹. Otra alternativa es una validación *in silico*, es decir, sobre los datos publicados por otros autores. Nuestra serie solo consta de CEE en estadios tempranos, por lo que resulta difícil de comparar con otras series disponibles, que habitualmente incluyen tumores en diferentes estadios y de otros tipos histológicos.

7. CONCLUSIONES

1. El grado histológico es el único factor clínico-patológico que se asocia de manera significativa con la SLE y con la SG.
2. El gen *PLK2* es un factor de riesgo en relación a SLE mientras que los genes *PLK1* y *EGFR* son factores de riesgo en relación a SG.
3. Se han identificado dos perfiles de expresión génica relacionados con distintos procesos como TEM, angiogénesis y ciclo celular, que diferencian dos subgrupos de pacientes en cuanto al pronóstico de las mismas. El perfil de SLE consta de 3 genes, siendo *PLK2* el de mayor influencia, mientras que el perfil de SG se compone de 10 genes, de los cuales *PLK1* y *EGFR* son los que tienen un papel más destacado.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer*. 2015;136(5):E359–86. doi:10.1002/ijc.29210.
3. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15(1):10–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6822361>. Accessed May 21, 2017.
4. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial carcinoma: More than two types. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):e268–e278. doi:10.1016/S1470-2045(13)70591-6.
5. Brinton LA, Felix AS, McMeekin DS, et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: Evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecol Oncol*. 2013;129(2):277–284. doi:10.1016/j.ygyno.2013.02.023.
6. Voss MA, Ganesan R, Ludeman L, et al. Should grade 3 endometrioid endometrial carcinoma be considered a type 2 cancer—a clinical and pathological evaluation. *Gynecol Oncol*. 2012;124(1):15–20. doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.030.
7. Soslow RA, Bissonnette JP, Wilton A, et al. Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(7):979–987. doi:10.1097/PAS.0b013e31802ee494.
8. Zannoni GF, Scambia G, Gallo D. The dualistic model of endometrial cancer: the challenge of classifying grade 3 endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012;127(1):262–263. doi:10.1016/j.ygyno.2011.09.036.
9. Abeler VM, Kjørstad KE. Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer*. 1992;69(2):488–495. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1728379>. Accessed May 22, 2017.
10. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 1991;68(10):2293–2302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1913465>. Accessed May 22, 2017.
11. Bartosch C, Manuel Lopes J, Oliva E. Endometrial carcinomas: a review emphasizing overlapping and distinctive morphological and immunohistochemical features. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(6):415–437. doi:10.1097/PAP.0b013e318234ab18.

12. Tobon H, Watkins GJ. Secretory adenocarcinoma of the endometrium. *Int J Gynecol Pathol.* 1985;4(4):328-335. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4086159>. Accessed May 25, 2017.
13. Zaino RJ, Kurman RJ, Brunetto VL, et al. Villoglandular adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathologic study of 61 cases: a gynecologic oncology group study. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(11):1379-1385. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808130>. Accessed May 21, 2017.
14. Melhem MF, Tobon H. Mucinous adenocarcinoma of the endometrium: a clinico-pathological review of 18 cases. *Int J Gynecol Pathol.* 1987;6(4):347-355. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826354>. Accessed May 25, 2017.
15. Han C-P, Lee M-Y, Kok L-F, et al. A reappraisal of three-marker (ER/Vim/CEA), four-marker (ER/Vim/CEA/PR), and five-marker (ER/Vim/CEA/PR/p16INK4a) panels in the diagnostic distinction between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281(5):845-850. doi:10.1007/s00404-009-1151-8.
16. Han G, Sidhu D, Duggan MA, et al. Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma. *Mod Pathol.* 2013;26(12):1594-1604. doi:10.1038/modpathol.2013.102.
17. Demopoulos RI, Genega E, Vamvakas E, Carlson E, Mittal K. Papillary carcinoma of the endometrium: morphometric predictors of survival. *Int J Gynecol Pathol.* 1996;15(2):110-118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786199>. Accessed May 25, 2017.
18. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol.* 1997;150(1):177-185. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006334>. Accessed May 21, 2017.
19. Lomo L, Nucci MR, Lee KR, et al. Histologic and immunohistochemical decision-making in endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2008;21(8):937-942. doi:10.1038/modpathol.2008.97.
20. Zannoni GF, Vellone VG, Arena V, et al. Does high-grade endometrioid carcinoma (grade 3 FIGO) belong to type I or type II endometrial cancer? A clinical-pathological and immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 2010;457(1):27-34. doi:10.1007/s00428-010-0939-z.
21. Yemelyanova A, Ji H, Shih I-M, Wang T-L, Wu L-S-F, Ronnett BM. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(10):1504-1514. doi:10.1097/PAS.0b013e3181ac35f5.

22. Chiesa-Vottero AG, Malpica A, Deavers MT, Broaddus R, Nuovo GJ, Silva EG. Immunohistochemical overexpression of p16 and p53 in uterine serous carcinoma and ovarian high-grade serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26(3):328-333. doi:10.1097/01.pgp.0000235065.31301.3e.
23. Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Soslow RA. Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod Pathol*. 2006;19(8):1091-1100. doi:10.1038/modpathol.3800620.
24. Vang R, Whitaker BP, Farhood AI, Silva EG, Ro JY, Deavers MT. Immunohistochemical analysis of clear cell carcinoma of the gynecologic tract. *Int J Gynecol Pathol*. 2001;20(3):252-259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11444201>. Accessed May 21, 2017.
25. Garg K, Leitao MM, Kauff ND, et al. Selection of Endometrial Carcinomas for DNA Mismatch Repair Protein Immunohistochemistry Using Patient Age and Tumor Morphology Enhances Detection of Mismatch Repair Abnormalities. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(6):925-933. doi:10.1097/PAS.0b013e318197a046.
26. Tafe LJ, Garg K, Chew I, Tornos C, Soslow RA. Endometrial and ovarian carcinomas with undifferentiated components: clinically aggressive and frequently underrecognized neoplasms. *Mod Pathol*. 2010;23(6):781-789. doi:10.1038/modpathol.2010.41.
27. Cantrell LA, Blank S V., Duska LR. Uterine carcinosarcoma: A review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2015;137(3):581-588. doi:10.1016/j.ygyno.2015.03.041.
28. Silverberg SG. Problems in the Differential Diagnosis of Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Mod Pathol*. 2000;13(3):309-327. doi:10.1038/modpathol.3880053.
29. Schenker JG, Cain JM. FIGO Committee Report. FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. International Federation of Gynecology and Obstetrics. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999;64(3):317-322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366059>. Accessed May 21, 2017.
30. Tavassoli FA. *Tumours of the Breast and Female Genitale Organs*; 2003. <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb4/BB4.pdf>. Accessed June 2, 2017.
31. Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 1995;75(1):81-86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7804981>. Accessed May 21, 2017.

32. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003;83 Suppl 1:79-118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14763170>. Accessed May 21, 2017.
33. Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. Pathologic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma: the importance of the distinction between surgical stage and clinical stage--a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 1996;77(6):1115-1121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635132>. Accessed May 21, 2017.
34. Lax SF, Kurman RJ, Pizer ES, Wu L, Ronnett BM. A binary architectural grading system for uterine endometrial endometrioid carcinoma has superior reproducibility compared with FIGO grading and identifies subsets of advance-stage tumors with favorable and unfavorable prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(9):1201-1208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976693>. Accessed May 21, 2017.
35. Gal D, Recio FO, Zamurovic D. The new International Federation of Gynecology and Obstetrics surgical staging and survival rates in early endometrial carcinoma. *Cancer.* 1992;69(1):200-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727664>. Accessed May 22, 2017.
36. Wolfson AH, Sightler SE, Markoe AM, et al. The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol.* 1992;45(2):142-146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1592280>. Accessed May 22, 2017.
37. Mikuta JJ. International federation of gynecology and obstetrics staging of endometrial cancer 1988. *Cancer.* 1993;71(S4):1460-1463. doi:10.1002/cncr.2820710409.
38. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):103-104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19367689>. Accessed June 2, 2017.
39. Maneschi M, Maneschi F, Geraci P, et al. Surgical pathological staging of endometrial carcinoma and results of treatment. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1992;13(1 Suppl):30-35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511711>. Accessed May 22, 2017.
40. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer.* 1987;60(8 Suppl):2035-2041. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3652025>. Accessed May 25, 2017.
41. Fanning J, Tsukada Y, Piver MS. Intraoperative frozen section diagnosis of depth of myometrial invasion in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.*

- 1990;37(1):47-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2323612>. Accessed May 22, 2017.
42. Boronow RC, Morrow CP, Creasman WT, et al. Surgical staging in endometrial cancer: clinical-pathologic findings of a prospective study. *Obstet Gynecol*. 1984;63(6):825-832. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6728365>. Accessed May 22, 2017.
43. Gal D, Recio FO, Zamurovic D, Tancer ML. Lymphovascular space involvement--a prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 1991;42(2):142-145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1894173>. Accessed May 22, 2017.
44. Mannelqvist M, Stefansson I, Salvesen HB, Akslen LA. Importance of tumour cell invasion in blood and lymphatic vasculature among patients with endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2009;54(2):174-183. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03201.x.
45. Lee KR, Vacek PM, Belinson JL. Traditional and Nontraditional Histopathologic Predictors of Recurrence in Uterine Endometrioid Adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 1994;54(1):10-18. doi:10.1006/gyno.1994.1158.
46. Abeler VM, Kjørstad KE. Serous papillary carcinoma of the endometrium: a histopathological study of 22 cases. *Gynecol Oncol*. 1990;39(3):266-271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2258069>. Accessed May 22, 2017.
47. Fanning J, Alvarez PM, Tsukada Y, Piver MS. Prognostic significance of the extent of cervical involvement by endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1991;40(1):46-47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989914>. Accessed May 22, 2017.
48. Jordan LB, Al-Nafussi A. Clinicopathological study of the pattern and significance of cervical involvement in cases of endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12(1):42-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860535>. Accessed May 22, 2017.
49. Nicklin JL, Petersen RW. Stage 3B adenocarcinoma of the endometrium: a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol*. 2000;78(2):203-207. doi:10.1006/gyno.2000.5849.
50. Boronow RC. Surgical staging of endometrial cancer: evolution, evaluation, and responsible challenge--a personal perspective. *Gynecol Oncol*. 1997;66(2):179-189. doi:10.1006/gyno.1997.4732.
51. Connell PP, Rotmensch J, Waggoner S, Mundt AJ. The Significance of Adnexal Involvement in Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1999;74(1):74-79. doi:10.1006/gyno.1999.5415.

52. Havrilesky LJ, Secord AA, O'Malley DM, et al. Multicenter analysis of recurrence and survival in stage IIIA endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;114(2):279-283. doi:10.1016/j.ygyno.2009.04.030.
53. Sato R, Jobo T, Kuramoto H. Parametrial spread is a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(3-4):241-245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807232>. Accessed May 22, 2017.
54. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 1991;40(1):55-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989916>. Accessed May 22, 2017.
55. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2004;35(6):649-662. doi:10.1016/j.humpath.2004.02.007.
56. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4783-4791. doi:10.1200/JCO.2006.06.7173.
57. Pilarski R. Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature. *J Genet Couns.* 2009;18(1):13-27. doi:10.1007/s10897-008-9187-7.
58. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, et al. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* 1997;57(18):3935-3940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307275>. Accessed May 22, 2017.
59. Liu F-S. Molecular Carcinogenesis of Endometrial Cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007;46(1):26-32. doi:10.1016/S1028-4559(08)60102-3.
60. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58(15):3254-3258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699651>. Accessed May 23, 2017.
61. Llobet D, Pallares J, Yeramian A, et al. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol.* 2009;62(9):777-785. doi:10.1136/jcp.2008.056101.
62. Samarthai N, Hall K, Yeh I-T. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:162363. doi:10.1155/2010/162363.
63. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology.* 2013;62(1):111-123. doi:10.1111/his.12053.

64. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol.* 2006;37(11):1465-1472. doi:10.1016/j.humpath.2006.05.007.
65. Karamurzin Y, Rutgers JKL. DNA Mismatch Repair Deficiency in Endometrial Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2009;28(3):239-255. doi:10.1097/PGP.0b013e31818d8fe6.
66. Catus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Mod Pathol.* 2009;22(4):522-529. doi:10.1038/modpathol.2009.5.
67. Mori N, Kyo S, Sakaguchi J, et al. Concomitant activation of AKT with extracellular-regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis. *Cancer Sci.* 2007;98(12):1881-1888. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00630.x.
68. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control.* 2009;16(1):8-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078924>. Accessed May 22, 2017.
69. Lagarda H, Catus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol.* 2001;193(2):193-199. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH769>3.0.CO;2-9.
70. Doll A, Abal M, Rigau M, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer- new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108(3-5):221-229. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.020.
71. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch.* 2004;444(3):213-223. doi:10.1007/s00428-003-0947-3.
72. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology.* 2007;39(1):72-87. doi:10.1080/00313020601136153.
73. Pallarés J, Velasco A, Eritja N, et al. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol.* 2008;21(6):691-699. doi:10.1038/modpathol.2008.38.
74. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, Palacios J, Hardisson D, Shiozawa T. Low Frequency of BRAF Mutations in Endometrial and in Cervical Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(12):3865-3866. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0284.
75. Folkins AK, Longacre TA. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology.* 2013;62(1):2-30. doi:10.1111/his.12028.

76. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol.* 1996;148(5):1671-1678. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623934>. Accessed May 22, 2017.
77. Broaddus RR, Lynch HT, Chen L-M, et al. Pathologic features of endometrial carcinoma associated with HNPCC: a comparison with sporadic endometrial carcinoma. *Cancer.* 2006;106(1):87-94. doi:10.1002/cncr.21560.
78. Catus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol.* 1998;29(10):1160-1164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781658>. Accessed May 22, 2017.
79. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):673-680. doi:10.1093/carcin/bgm228.
80. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene.* 1998;17(18):2413-2417. doi:10.1038/sj.onc.1202178.
81. van der Zee M, Jia Y, Wang Y, et al. Alterations in Wnt- β -catenin and Pten signalling play distinct roles in endometrial cancer initiation and progression. *J Pathol.* 2013;230(1):48-58. doi:10.1002/path.4160.
82. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, et al. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene.* 2002;21(52):7981-7990. doi:10.1038/sj.onc.1205924.
83. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH. Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol.* 2000;13(10):1066-1071. doi:10.1038/modpathol.3880196.
84. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):387-398. doi:10.1038/nrc2389.
85. Markowska A, Pawałowska M, Lubin J, Markowska J. Signalling pathways in endometrial cancer. *Contemp Oncol (Poznan, Poland).* 2014;18(3):143-148. doi:10.5114/wo.2014.43154.
86. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 1996;272(5264):1023-1026. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638126>. Accessed May 22, 2017.

87. Saegusa M, Okayasu I. Frequent nuclear β -catenin accumulation and associated mutations in endometrioid-type endometrial and ovarian carcinomas with squamous differentiation. *J Pathol*. 2001;194(1):59-67. doi:10.1002/path.856.
88. Yi T-Z, Guo J, Zhou L, et al. Prognostic Value of E-Cadherin Expression and CDH1 Promoter Methylation in Patients With Endometrial Carcinoma. *Cancer Invest*. 2011;29(1):86-92. doi:10.3109/07357907.2010.512603.
89. Abal M, Llauradó M, Doll A, et al. Molecular determinants of invasion in endometrial cancer. *Clin Transl Oncol*. 2007;9(5):272-277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525037>. Accessed May 22, 2017.
90. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol*. 1995;26(11):1268-1274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590703>. Accessed May 22, 2017.
91. Evans MP, Podratz KC. Endometrial neoplasia: prognostic significance of ploidy status. *Clin Obstet Gynecol*. 1996;39(3):696-706. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8862893>. Accessed May 22, 2017.
92. Garg K, Leitao MM, Wynveen CA, et al. p53 overexpression in morphologically ambiguous endometrial carcinomas correlates with adverse clinical outcomes. *Mod Pathol*. 2010;23(1):80-92. doi:10.1038/modpathol.2009.153.
93. Pijnenborg JMA, van de Broek L, Dam de Veen GC, et al. TP53 overexpression in recurrent endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006;100(2):397-404. doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.056.
94. Lee E-J, Kim T-J, Kim DS, et al. p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review. *Gynecol Oncol*. 2010;116(3):533-538. doi:10.1016/j.ygyno.2009.11.018.
95. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(15):2376-2385. doi:10.1200/JCO.2005.03.4827.
96. Velasco A, Pallares J, Santacana M, et al. Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. *Hum Pathol*. 2011;42(2):185-193. doi:10.1016/j.humpath.2010.08.001.
97. Gatus S, Velasco A, Azueta A, et al. FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24(11):1500-1510. doi:10.1038/modpathol.2011.110.

98. Oehler MK, Rees MC, Bicknell R. Steroids and the endometrium. *Curr Med Chem.* 2000;7(5):543-560. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702624>. Accessed May 22, 2017.
99. Jazaeri AA, Nunes KJ, Dalton MS, Xu M, Shupnik MA, Rice LW. Well-differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression. *Oncogene.* 2001;20(47):6965-6969. doi:10.1038/sj.onc.1204809.
100. Cheng KW, Cheng CK, Leung PC. Differential role of PR-A and -B isoforms in transcription regulation of human GnRH receptor gene. *Mol Endocrinol.* 2001;15(12):2078-2092. doi:10.1210/mend.15.12.0739.
101. Arnett-Mansfield RL, deFazio A, Wain G V, et al. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res.* 2001;61(11):4576-4582. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389093>. Accessed May 22, 2017.
102. Ma X, Ma CX, Wang J. Endometrial Carcinogenesis and Molecular Signaling Pathways. *Am J Mol Biology.* 2014;4(July):134-149. doi:10.4236/ajmb.2014.43015.
103. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology.* 2007;39(3):305-318. doi:10.1080/00313020701329914.
104. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-454. doi:10.1038/nrc822.
105. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol.* 2010;21(Supplement 7):vii89-vii92. doi:10.1093/annonc/mdq292.
106. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis. *Cell.* 2004;118(3):277-279. doi:10.1016/j.cell.2004.07.011.
107. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem.* 1996;61(4):514-523. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<514::AID-JCB4>3.0.CO;2-R.
108. Rowlands TM, Symonds JM, Farookhi R, Blaschuk OW. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev Reprod.* 2000;5(1):53-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711736>. Accessed May 23, 2017.
109. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent

- manner. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1049-1060. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381089>. Accessed May 23, 2017.
110. Montserrat N, Mozos A, Llobet D, et al. Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(5):632-643. doi:10.1016/j.humpath.2011.06.021.
 111. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol.* 2006;37(4):431-438. doi:10.1016/j.humpath.2005.12.021.
 112. Sakuragi N, Nishiya M, Ikeda K, et al. Decreased E-cadherin expression in endometrial carcinoma is associated with tumor dedifferentiation and deep myometrial invasion. *Gynecol Oncol.* 1994;53(2):183-189. doi:10.1006/gyno.1994.1113.
 113. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):616-630. doi:10.1038/nrm3434.
 114. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005;132(14):3151-3161. doi:10.1242/dev.01907.
 115. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer.* 2006;94(1):13-17. doi:10.1038/sj.bjc.6602876.
 116. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell.* 2008;14(1):79-89. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.005.
 117. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-428. doi:10.1038/nrc2131.
 118. Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* 2008;133(4):704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
 119. Knutson KL, Lu H, Stone B, et al. Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J Immunol.* 2006;177(3):1526-1533. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849459>. Accessed May 23, 2017.
 120. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming Growth Factor β -1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines. *J Biol Chem.* 2003;278(23):21113-21123. doi:10.1074/jbc.M211304200.
 121. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal

- transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*. 2007;26(5):711–724. doi:10.1038/sj.onc.1209808.
122. Vong S, Kalluri R. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1139–1145. doi:10.1177/1947601911423940.
 123. Teng F, Tian W-Y, Wang Y-M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):8. doi:10.1186/s13045-015-0231-4.
 124. Kirschner C V, Alanis-Amezcu JM, Martin VG, et al. Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator? *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(6):1879–82–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8678154>. Accessed May 23, 2017.
 125. Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, et al. Angiogenesis in endometrial carcinoma. *Cancer*. 1997;80(4):741–747. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9264358>. Accessed May 23, 2017.
 126. Sivridis E. Angiogenesis and endometrial cancer. *Anticancer Res*. 2001;21(6B):4383–4388. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908694>. Accessed May 23, 2017.
 127. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):329–337. doi:10.1016/j.semcancer.2009.05.003.
 128. Yang AD, Camp ER, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006;66(1):46–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3086.
 129. Peinado H, Marin F, Cubillo E, et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2827–2839. doi:10.1242/jcs.01145.
 130. Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):38–47. doi:10.1038/nrc704.
 131. Masson N, Ratcliffe PJ. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab*. 2014;2(1):3. doi:10.1186/2049-3002-2-3.
 132. Evans AJ, Russell RC, Roche O, et al. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol*. 2007;27(1):157–169. doi:10.1128/MCB.00892-06.

133. Schmid T, Zhou J, Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med.* 2004;8(4):423-431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15601571>. Accessed May 23, 2017.
134. Weinmann M, Belka C, Plasswilm L. Tumour Hypoxia: Impact on Biology, Prognosis and Treatment of Solid Malignant Tumours. *Oncol Res Treat.* 2004;27(1):83-90. doi:10.1159/000075611.
135. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(4):297-307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927570>. Accessed May 23, 2017.
136. Le Q-T, Denko NC, Giaccia AJ. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(3/4):293-310. doi:10.1023/B:CANC.0000031768.89246.d7.
137. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
138. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 2013;342(6159):1234850. doi:10.1126/science.1234850.
139. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell.* 2012;22(6):725-736. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.022.
140. Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, et al. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1849-1868. doi:10.1172/JCI59218.
141. Brabletz T. EMT and MET in Metastasis: Where Are the Cancer Stem Cells? *Cancer Cell.* 2012;22(6):699-701. doi:10.1016/j.ccr.2012.11.009.
142. Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med.* 2016;5(3):37. doi:10.3390/jcm5030037.
143. Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog.* 2014;19(5):349-361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404150>. Accessed May 23, 2017.
144. Cheung LWT, Hennessy BT, Li J, et al. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov.* 2011;1(2):170-185. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0039.

145. McConechy MK, Ding J, Cheang MCU, et al. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol.* 2012;228(1):20-30. doi:10.1002/path.4056.
146. Byron SA, Gartside M, Powell MA, et al. FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. Katoh M, ed. *PLoS One.* 2012;7(2):e30801. doi:10.1371/journal.pone.0030801.
147. Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F, et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *J Clin Oncol.* 2007;25(15):2042-2048. doi:10.1200/JCO.2006.08.2107.
148. Kuhn E, Wu R-C, Guan B, et al. Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(19):1503-1513. doi:10.1093/jnci/djs345.
149. Getz G, Gabriel SB, Cibulskis K, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.* 2013;497(7447):67-73. doi:10.1038/nature12113.
150. Le Gallo M, Bell DW. The emerging genomic landscape of endometrial cancer. *Clin Chem.* 2014;60(1):98-110. doi:10.1373/clinchem.2013.205740.
151. Pursell ZF, Kunkel TA. DNA polymerase epsilon: a polymerase of unusual size (and complexity). *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2008;82:101-145. doi:10.1016/S0079-6603(08)00004-4.
152. An HJ, Kim K Il, Kim JY, et al. Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma is associated with poor prognostic indicators. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(6):846-853. doi:10.1097/01.pas.0000213423.30880.ac.
153. Prat J, Oliva E, Lerma E, Vaquero M, Matías-Guiu X. Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10-case study of p53 and c-erbB-2 expression and DNA content. *Cancer.* 1994;74(6):1778-1783. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915964>. Accessed May 23, 2017.
154. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>. Accessed May 25, 2017.
155. Paik S, Kim C, Song Y, Kim W. Technology Insight: application of molecular techniques to formalin-fixed paraffin-embedded tissues from breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005;2(5):246-254. doi:10.1038/ncponc0171.

156. George B, Seals S, Aban I. Survival analysis and regression models. *J Nucl Cardiol*. 2014;21(4):686–694. doi:10.1007/s12350-014-9908-2.
157. Schapire RE. The Boosting Approach to Machine Learning An Overview. *Nonlinear Estim Classif*. 2003. www.research.att.com/. Accessed May 20, 2017.
158. Tibshirani R. Regression selection and shrinkage via the lasso. *J R Stat Soc B*. 1996;58(1):267–288. doi:10.2307/2346178.
159. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95 Suppl 1:S105–43. doi:10.1016/S0020-7292(06)60031-3.
160. Gadducci A, Cosio S, Fanucchi A, Cristofani R, Genazzani AR. An intensive follow-up does not change survival of patients with clinical stage I endometrial cancer. *Anticancer Res*. 20(3B):1977–1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10928137>. Accessed May 20, 2017.
161. Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, et al. Analysis of outcome of Stage I–III endometrial cancer treated with systematic operation omitting paraaortic lymphadenectomy. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007;28(3):170–173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624080>. Accessed May 20, 2017.
162. Tuomi T, Pasanen A, Leminen A, Bützow R, Loukovaara M. Prediction of Site-Specific Tumor Relapses in Patients With Stage I–II Endometrioid Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(5):923–930. doi:10.1097/IGC.0000000000000970.
163. Matias-Guiu X, Davidson B. Prognostic biomarkers in endometrial and ovarian carcinoma. *Virchows Arch*. 2014;464(3):315–331. doi:10.1007/s00428-013-1509-y.
164. Fujimoto T, Nanjyo H, Fukuda J, et al. Endometrioid uterine cancer: histopathological risk factors of local and distant recurrence. *Gynecol Oncol*. 2009;112(2):342–347. doi:10.1016/j.ygyno.2008.10.019.
165. Kitchener H, Swart AMC, Qian Q, Amos C, Parmar MKB. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9658):125–136. doi:10.1016/S0140-6736(08)61766-3.
166. Tejerizo-García Á, S Jiménez-López J, Muñoz-González JL, et al. Overall survival and disease-free survival in endometrial cancer: prognostic factors in 276 patients. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1305–1313. doi:10.2147/OTT.S51532.

167. Han KH, Kim HS, Lee M, Chung HH, Song YS. Prognostic factors for tumor recurrence in endometrioid endometrial cancer stages IA and IB. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(21):e6976. doi:10.1097/MD.00000000000006976.
168. Bellacosa A, Kumar CC, Cristofano A Di, Testa JR. Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting. *Adv Cancer Res*. 2005;94:29-86. doi:10.1016/S0065-230X(05)94002-5.
169. Testa JR, Bellacosa a. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):10983-10985. doi:10.1073/pnas.211430998.
170. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of Akt isoforms in the uterus. *Reproduction*. 2014;148(5):R85-R95. doi:10.1530/REP-14-0270.
171. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(7):1242-1252. doi:10.1200/JCO.2004.09.034.
172. Nakopoulou L, Gakiopoulou-Givalou H, Karayiannakis AJ, et al. Abnormal alpha-catenin expression in invasive breast cancer correlates with poor patient survival. *Histopathology*. 2002;40(6):536-546. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01392.x.
173. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, et al. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol*. 2003;199(4):471-478. doi:10.1002/path.1310.
174. Felix AS, Stone RA, Chivukula M, et al. Survival outcomes in endometrial cancer patients are associated with CXCL12 and estrogen receptor expression. *Int J Cancer*. 2012;131(2):E114-21. doi:10.1002/ijc.27317.
175. Walentowicz-Sadlecka M, Sadlecki P, Bodnar M, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1) and its receptors CXCR4 and CXCR7 in endometrial cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(1):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0084629.
176. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*. 1996;379(6560):91-96. doi:10.1038/379091a0.
177. Yan W, Shao R. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19700-19708. doi:10.1074/jbc.M601856200.
178. McPhee TR, McDonald PC, Oloumi A, Dedhar S. Integrin-linked kinase regulates E-cadherin expression through PARP-1. *Dev Dyn*. 2008;237(10):2737-2747. doi:10.1002/dvdy.21685.

179. Campo L, Zhang C, Breuer EK. EMT-inducing molecular factors in gynecological cancers. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/420891.
180. Troussard a a, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7420-7427. doi:10.1128/MCB.19.11.7420.
181. Fielding AB, Dobrev I, McDonald PC, Foster LJ, Dedhar S. Integrin-linked kinase localizes to the centrosome and regulates mitotic spindle organization. *J Cell Biol*. 2008;180(4):681-689. doi:10.1083/jcb.200710074.
182. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126(14):3047-3055. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375497>. Accessed May 21, 2017.
183. Calcagno C, Lobatto ME, Robson PM, Millon A. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. 2016;28(10):1304-1314. doi:10.1002/nbm.3369.Three.
184. Moreno-bueno G, Sánchez-estévez C, Cassia R, et al. Differential Gene Expression Profile in Endometrioid and Nonendometrioid Endometrial Carcinoma: Advances in Brief Differential Gene Expression Profile in Endometrioid and Nonendometrioid Endometrial Carcinoma: STK15 Is Frequently Overexpressed and Ampli. *Cancer Res*. 2003;5697-5702.
185. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85. doi:10.2144/05391RV01.
186. Tournoud M, Larue A, Cazalis M-A, et al. A strategy to build and validate a prognostic biomarker model based on RT-qPCR gene expression and clinical covariates. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(1):106. doi:10.1186/s12859-015-0537-9.
187. Zeka F, Vanderheyden K, De Smet E, Cuvelier CA, Mestdagh P, Vandesompele J. Straightforward and sensitive RT-qPCR based gene expression analysis of FFPE samples. *Sci Rep*. 2016;6(1):21418. doi:10.1038/srep21418.
188. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Investig*. 2005;85(8):1040-1050. doi:10.1038/labinvest.3700303.
189. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*. 2002;8(6):257-260. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067606>. Accessed May 21, 2017.

190. Kong H, Zhu M, Cui F, et al. Quantitative assessment of short amplicons in FFPE-derived long-chain RNA. *Sci Rep.* 2014;4(1):7246. doi:10.1038/srep07246.
191. Greytak SR, Engel KB, Bass BP, Moore HM. Accuracy of Molecular Data Generated with FFPE Biospecimens: Lessons from the Literature. *Cancer Res.* 2015;75(8):1541-1547. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2378.
192. Xie R, Chung J-Y, Ylaya K, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(4):356-365. doi:10.1369/0022155411398488.
193. Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004;164(1):35-42. doi:10.1016/S0002-9440(10)63093-3.
194. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. Fraser P, ed. *PLoS One.* 2007;2(12):e1261. doi:10.1371/journal.pone.0001261.
195. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(12):1929-1935. doi:10.1043/1543-2165-132.12.1929.
196. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, et al. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* 2000;2(2):84-91. doi:10.1016/S1525-1578(10)60621-6.
197. Sánchez-Navarro I, Gámez-Pozo A, González-Barón M, et al. Comparison of gene expression profiling by reverse transcription quantitative PCR between fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded breast cancer tissues. *Biotechniques.* 2010;48(5):389-397. doi:10.2144/000113388.
198. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004;15(3):155-166. doi:15/3/155 [pii].
199. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem.* 2002;309(2):293-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413463>. Accessed May 21, 2017.
200. Abruzzo L V., Lee KY, Fuller A, et al. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: A new statistical method to normalize

- real-time RT-PCR data. *Biotechniques*. 2005;38(5):785-792. doi:10.2144/05385MT01.
201. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*. 2002;2(5):353-361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450790>. Accessed May 21, 2017.
 202. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2016;374(2065):20150202. doi:10.1098/rsta.2015.0202.
 203. Boulesteix A-L, Strimmer K. Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. *Brief Bioinform*. 2007;8(1):32-44. doi:10.1093/bib/bbl016.
 204. de Vlaming R, Groenen PJF. The Current and Future Use of Ridge Regression for Prediction in Quantitative Genetics. *Biomed Res Int*. 2015;2015:143712. doi:10.1155/2015/143712.
 205. Ejskjær K, Sørensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;104(1):158-167. doi:10.1016/j.ygyno.2006.07.015.
 206. Hipp S, Walch A, Schuster T, et al. Activation of epidermal growth factor receptor results in Snail protein but not mRNA overexpression in endometrial cancer. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9 B):3858-3867. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00526.x.
 207. Lo H-W, Hsu S-C, Xia W, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. *Cancer Res*. 2007;67(19):9066-9076. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0575.
 208. Ebert AD, Wechselberger C, Martinez-Lacaci I, Bianco C, Weitzel HK, Salomon DS. Expression and function of EGF-related peptides and their receptors in gynecological cancer--from basic science to therapy. *J Recept Signal Transduct Res*. 2000;20(1):1-46. doi:10.3109/10799890009150035.
 209. Yamane K, Asano Y, Tamaki K, Ihn H. Epidermal growth factor up-regulates transforming growth factor-beta receptor type II in human dermal fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(1):69-77. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.148.
 210. Konecny GE, Venkatesan N, Yang G, et al. Activity of lapatinib a novel HER2 and EGFR dual kinase inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer*. 2008;98(6):1076-1084. doi:10.1038/sj.bjc.6604278.

211. Khalifa MA, Mannel RS, Haraway SD, Walker J, Min KW. Expression of EGFR, HER-2/neu, P53, and PCNA in endometrioid, serous papillary, and clear cell endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol.* 1994;53(1):84-92. doi:10.1006/gyno.1994.1092.
212. Niikura H, Sasano H, Matsunaga G, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol.* 1995;26(8):892-896. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635451>. Accessed May 21, 2017.
213. Konecny GE, Santos L, Winterhoff B, et al. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(1):89-95. doi:10.1038/sj.bjc.6604814.
214. Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukheim R, et al. HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol.* 2008;32(2):307-316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202752>. Accessed May 21, 2017.
215. Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 2003;4(6):499-515. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706341>. Accessed May 21, 2017.
216. Venkov CD, Link AJ, Jennings JL, et al. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007;117(2):482-491. doi:10.1172/JCI29544.
217. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(4):265-275. doi:10.1038/nrm2653.
218. Zitouni S, Nabais C, Jana SC, Guerrero A, Bettencourt-Dias M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):433-452. doi:10.1038/nrm3819.
219. Li H, Wang Y, Liu X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase IIalpha in cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6209-6221. doi:10.1074/jbc.M709007200.
220. Smits VA, Klompaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol.* 2000;2(9):672-676. doi:10.1038/35023629.
221. Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT, El-Deiry WS. Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed

- cells. *Mol Cell Biol.* 2003;23(16):5556-5571. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897130>. Accessed May 21, 2017.
222. Matthew EM, Yen TJ, Dicker DT, et al. Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells. *Cell Cycle.* 2007;6(20):2571-2578. doi:10.4161/cc.6.20.5079.
 223. Seeburg DP, Pak D, Sheng M. Polo-like kinases in the nervous system. *Oncogene.* 2005;24(2):292-298. doi:10.1038/sj.onc.1208277.
 224. Seeburg DP, Sheng M. Activity-induced Polo-like kinase 2 is required for homeostatic plasticity of hippocampal neurons during epileptiform activity. *J Neurosci.* 2008;28(26):6583-6591. doi:10.1523/JNEUROSCI.1853-08.2008.
 225. Yim H, Erikson RL. Plk1-targeted therapies in TP53- or RAS-mutated cancer. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2014;761:31-39. doi:10.1016/j.mrrev.2014.02.005.
 226. Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(10):773-785. doi:10.1038/nrc1714.
 227. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, et al. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25549-25561. doi:10.1074/jbc.M314182200.
 228. Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8672-8676. doi:10.1073/pnas.132269599.
 229. Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5789-5794. doi:10.1073/pnas.1031523100.
 230. Guan R, Tapang P, Levenson JD, Albert D, Giranda VL, Luo Y. Small Interfering RNA-Mediated Polo-Like Kinase 1 Depletion Preferentially Reduces the Survival of p53-Defective, Oncogenic Transformed Cells and Inhibits Tumor Growth in Animals. *Cancer Res.* 2005;65(7). <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/7/2698>. Accessed May 27, 2017.
 231. Raab M, Kappel S, Krämer A, et al. Toxicity modelling of Plk1-targeted therapies in genetically engineered mice and cultured primary mammalian cells. *Nat Commun.* 2011;2:395. doi:10.1038/ncomms1395.
 232. Luo J, Emanuele MJ, Li D, et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell.* 2009;137(5):835-848. doi:10.1016/j.cell.2009.05.006.

233. Kyung S. Lee, Terrence R. Burke Jr., Jung-Eun Park, Jeong K. Bang and EL. Recent advances and new strategies in targeting Plk1 for anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(12):858-877. doi:10.1002/nbm.3369.Three.
234. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett.* 2001;169(1):41-49. doi:10.1016/S0304-3835(01)00522-5.
235. Knecht R, Oberhauser C, Strebhardt K. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int J cancer.* 2000;89(6):535-536. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102900>. Accessed May 21, 2017.
236. Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A potential target for cancer therapy. *Transl Oncol.* 2017;10(1):22-32. doi:10.1016/j.tranon.2016.10.003.
237. Mell LK, Meyer JJ, Tretiakova M, et al. Prognostic Significance of E-Cadherin Protein Expression in Pathological Stage I-III Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16). <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/16/5546.long>. Accessed May 27, 2017.
238. Ferguson SE. Stratification of Intermediate-Risk Endometrial Cancer Patients into Groups at High Risk or Low Risk for Recurrence Based on Tumor Gene Expression Profiles. *Clin Cancer Res.* 2005;11(6):2252-2257. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1353.
239. Wik E, Trovik J, Kusonmano K, et al. Endometrial Carcinoma Recurrence Score (ECARS) validates to identify aggressive disease and associates with markers of epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations. *Gynecol Oncol.* 2014;134(3):599-606. doi:10.1016/j.ygyno.2014.06.026.
240. Dai D, Thiel KW, Salinas EA, Goodheart MJ, Leslie KK, Gonzalez Bosquet J. Stratification of endometrioid endometrial cancer patients into risk levels using somatic mutations. *Gynecol Oncol.* 2016;142(1):150-157. doi:10.1016/j.ygyno.2016.05.012.
241. O'Mara TA, Zhao M, Spurdle AB. Meta-analysis of gene expression studies in endometrial cancer identifies gene expression profiles associated with aggressive disease and patient outcome. *Sci Rep.* 2016;6(1):36677. doi:10.1038/srep36677.
242. Sung CO, Sohn I. The expression pattern of 19 genes predicts the histology of endometrial carcinoma. *Sci Rep.* 2014;4:1-8. doi:10.1038/srep05174.
243. Maxwell GL, Chandramouli GVR, Dainty L, et al. Microarray Analysis of Endometrial Carcinomas and Mixed Mullerian Tumors Reveals Distinct Gene Expression Profiles Associated with Different Histologic Types of Uterine Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11).

- <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/11/4056.long>. Accessed May 27, 2017.
244. Westin SN, Broaddus RR, Deng L, et al. Molecular clustering of endometrial carcinoma based on estrogen-induced gene expression. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(22):2126-2135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755863>. Accessed May 27, 2017.
245. Wik E, Ræder MB, Krakstad C, et al. Lack of estrogen receptor- α is associated with epithelial-mesenchymal transition and PI3K alterations in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1094-1105. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3039.
246. Nardella C, Lunardi A, Fedele G, et al. Differential Expression of S6K2 Dictates Tissue-Specific Requirement for S6K1 in Mediating Aberrant mTORC1 Signaling and Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2011;71(10):3669-3675. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3962.
247. Goh ETH, Pardo OE, Michael N, et al. Involvement of Heterogeneous Ribonucleoprotein F in the Regulation of Cell Proliferation via the Mammalian Target of Rapamycin/S6 Kinase 2 Pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(22):17065-17076. doi:10.1074/jbc.M109.078782.
248. Yao Y, Chen Y, Wang Y, et al. Molecular classification of human endometrial cancer based on gene expression profiles from specialized microarrays. *Int J Gynaecol Obs.* 2010;110(2):125-129. doi:S0020-7292(10)00172-4 [pii]r10.1016/j.ijgo.2010.03.020 [doi].
249. Zhang Y, Zhang W, Li X, et al. Prognostic factors and genes associated with endometrial cancer based on gene expression profiling by bioinformatics analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(6):1287-1295. doi:10.1007/s00404-015-3886-8.
250. Bidus MA, Risinger JI, Chandramouli GVR, et al. Prediction of lymph node metastasis in patients with endometrioid endometrial cancer using expression microarray. *Clin Cancer Res.* 2006;12(1):83-88. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0835.
251. Ohta, Fukuda, Arima, et al. Analysis of Cdc2 and Cyclin D1 Expression in Breast Cancer by Immunoblotting. *Breast Cancer.* 1997;4(1):17-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11091571>. Accessed May 27, 2017.
252. Ikeda Y, Oda K, Ishihara H, et al. Prognostic importance of CDK4/6-specific activity as a predictive marker for recurrence in patients with endometrial cancer, with or without adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer.* 2015;113(10):1477-1483. doi:10.1038/bjc.2015.369.

253. Monge M, Doll A, Colas E, et al. Subtractive Proteomic Approach to the Endometrial Carcinoma Invasion Front. *J Proteome Res.* 2009;8(10):4676-4684. doi:10.1021/pr900390t.
254. Muinelo-Romay L, Colas E, Barbazan J, et al. High-Risk Endometrial Carcinoma Profiling Identifies TGF- 1 as a Key Factor in the Initiation of Tumor Invasion. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(8):1357-1366. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-1019.
255. Nguyen T, Mège RM. N-Cadherin and Fibroblast Growth Factor Receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations. *Eur J Cell Biol.* 2016;95(11):415-426. doi:10.1016/j.ejcb.2016.05.002.
256. Singh M, Darcy KM, Brady WE, et al. Cadherins, catenins and cell cycle regulators: Impact on survival in a Gynecologic Oncology Group phase II endometrial cancer trial. *Gynecol Oncol.* 2011;123(2):320-328. doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.005.
257. Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, et al. Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(1):13-19. doi:10.4161/cbt.22625.
258. Feng Z, Gan H, Cai Z, et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1 α , TWIST and E-cadherin is associated with aggressive tumor phenotypes in endometrioid endometrial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43(4):396-403. doi:10.1093/jjco/hys237.
259. Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Cancer.* 2003;97(4):1002-1009. doi:10.1002/cncr.11157.
260. Supernat A, Lapinska-Szumczyk S, Majewska H, et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2013;33(12):5461-5469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324082>.
261. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med.* 2013;273(2):114-127. doi:10.1111/joim.12019.
262. Kieran MW, Kalluri R, Cho Y-J. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(12):a006593. doi:10.1101/cshperspect.a006593.
263. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer.* 1996;78(3):454-460. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<454::AID-CNCR12>3.0.CO;2-Y.

264. Zyla MM, Kostrzewa M, Litwińska E, Szpakowski A, Wilczyński JR, Stetkiewicz T. The role of angiogenic factors in endometrial cancer. *Prz Menopauzalny*. 2014;18(2):122-126. doi:10.5114/pm.2014.42714.
265. Giatromanolaki A, Sivridis E, Brekken R, et al. The angiogenic "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor" pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Cancer*. 2001;92(10):2569-2577. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745191>. Accessed June 5, 2017.
266. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res*. 2006;66(6):3303-3309. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1163.
267. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*. 1999;79(5-6):991-995. doi:10.1038/sj.bjc.6690158.
268. Mannelqvist M, Stefansson IM, Bredholt G, et al. Gene expression patterns related to vascular invasion and aggressive features in endometrial cancer. *Am J Pathol*. 2011;178(2):861-871. doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.040.
269. Stefansson IM, Raeder M, Wik E, et al. Increased angiogenesis is associated with a 32-gene expression signature and 6p21 amplification in aggressive endometrial cancer. *Oncotarget*. 2015;6(12):10634-10645. doi:10.18632/oncotarget.3521.
270. Fehrmann RSN, Li X -y., van der Zee AGJ, et al. Profiling Studies in Ovarian Cancer: A Review. *Oncologist*. 2007;12(8):960-966. doi:10.1634/theoncologist.12-8-960.
271. Simon RM, Subramanian J, Li MC, Menezes S. Using cross-validation to evaluate predictive accuracy of survival risk classifiers based on high-dimensional data. *Brief Bioinform*. 2011;12(3):203-214. doi:10.1093/bib/bbr001.

9. ANEXO

Tabla 1 del anexo. Genes descritos implicados en el desarrollo del CE.

Gen	Código Unigene	Nombre del Gen/descripción
AKT1	Hs00178289	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AKT2	Hs01086102	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>
AKT3	Hs00178533	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)</i>
AURKB	Hs00177782	<i>aurora kinase B</i>
BRAF	Hs00269944	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CAV1	Hs00971716	<i>caveolin 1, caveolae protein, 22kDa</i>
CDH1	Hs01023895	<i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
CDH11	Hs00901475	<i>cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)</i>
CDH2	Hs00983062	<i>cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)</i>
CDH3	Hs00169968	<i>cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)</i>
CTNNA1	Hs00944794	<i>catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa</i>
CTNNB1	Hs00355049	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>
CTNND1	Hs00609741	<i>catenin (cadherin-associated protein), delta 1</i>
CXCL12	Hs00171022	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)</i>
CXCR4	Hs00976734	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
EFNB2	Hs00970627	<i>ephrin-B2</i>
EGFR	Hs01076092	<i>epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog, avian)</i>
EPHB4	Hs00174752	<i>EPH receptor B4</i>
ERBB2	Hs01001595	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (avian)</i>
ERBB3	Hs00951455	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)</i>
ERBB4	Hs00171783	<i>v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)</i>
ESR1	Hs01046818	<i>estrogen receptor 1</i>
ESR2	Hs00230957	<i>estrogen receptor 2 (ER beta)</i>
FGFR2	Hs01552926	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FLT1	Hs01052937	<i>fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor)</i>
FLT4	Hs01047679	<i>fms-related tyrosine kinase 4</i>
FRAP1	Hs00234522	<i>FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1</i>
GPER	Hs01922715	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
GSK3B	Hs00275656	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HIF1A	Hs00936368	<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)</i>
ID1	Hs00357821	<i>inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
ID2	Hs00747379	<i>inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
ID3	Hs00171409	<i>inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
ID4	Hs00155465	<i>inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
IGF1R	Hs99999020	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IL6R	Hs00794121	<i>interleukin 6 receptor</i>
ILK	Hs00177914	<i>integrin-linked kinase</i>
JUP	Hs00158408	<i>junction plakoglobin</i>
KDR	Hs00911700	<i>kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)</i>

Gen	Código Unigene	Nombre del Gen/descripción
KIT	Hs00174029	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRAS	Hs00270666	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LYVE1	Hs00272659	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
MET	Hs01565580	<i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
NEK2	Hs00601227	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2</i>
PDGFRB	Hs01019589	<i>platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>
PKD1	Hs00176853	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
PKD2	Hs00176865	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2</i>
PGR	Hs01556707	<i>progesterone receptor</i>
PIK3C2A	Hs00153223	<i>phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide</i>
PIK3C2B	Hs00153248	<i>phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide</i>
PIK3C3	Hs00176908	<i>phosphoinositide-3-kinase, class 3</i>
PIK3CA	Hs00907951	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
PIK3CB	Hs00927728	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide</i>
PIK3CD	Hs00192399	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>
PIK3CG	Hs00176916	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide</i>
PIK3R1	Hs00933163	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
PIK3R2	Hs00178181	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)</i>
PIK3R3	Hs00177524	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)</i>
PIK3R4	Hs00300795	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4</i>
PIK3R5	Hs00204803	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5</i>
PINK1	Hs00260868	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PLK1	Hs00983233	<i>polo-like kinase 1 (Drosophila)</i>
PLK2	Hs00198320	<i>polo-like kinase 2 (Drosophila)</i>
PTEN	Hs02621230	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RPS6KB2	Hs00177689	<i>ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2</i>
SNAI1	Hs00195591	<i>snail homolog 1 (Drosophila)</i>
SNAI2	Hs00950344	<i>snail homolog 2 (Drosophila)</i>
SNAI3	Hs01018996	<i>snail homolog 3 (Drosophila)</i>
SPARC	Hs00234160	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>
TWIST1	Hs00361186	<i>twist homolog 1 (Drosophila)</i>
VEGFA	Hs00900055	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFB	Hs00173634	<i>vascular endothelial growth factor B</i>
VEGFC	Hs01099203	<i>vascular endothelial growth factor C</i>
VHL	Hs00184451	<i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
ZEB1	Hs01566407	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	Hs00207691	<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>

Tabla 2 del anexo. Valores de expresión de los 76 genes obtenidos mediante el análisis de las tarjetas TLDA

GEN	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	GEN	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO
<i>AKT1</i>	1,02	-3,29	7,34	<i>KDR</i>	4,16	0,49	9,47
<i>AKT2</i>	1,09	-2,83	7,34	<i>KIT</i>	3,95	1,31	9,47
<i>AKT3</i>	4,41	-0,85	9,95	<i>KRAS</i>	4,18	-2,83	9,47
<i>AURKB</i>	6,52	-0,33	11,16	<i>LYVE1</i>	5,99	0,45	10,19
<i>BRAF</i>	3,01	0,48	8,40	<i>MET</i>	5,42	1,31	10,57
<i>CAV1</i>	0,37	-3,31	3,12	<i>NEK2</i>	6,27	-3,17	11,65
<i>CDH1</i>	0,31	-3,41	8,80	<i>PDGFRB</i>	0,64	-3,80	8,40
<i>CDH11</i>	2,81	0,43	5,53	<i>PDK1</i>	2,15	-1,42	7,34
<i>CDH2</i>	3,78	0,15	9,95	<i>PDK2</i>	4,55	1,04	7,81
<i>CDH3</i>	4,23	0,27	9,47	<i>PGR</i>	1,96	-1,71	8,40
<i>CTNNA1</i>	-0,14	-2,38	4,20	<i>PIK3C2A</i>	4,33	0,48	7,89
<i>CTNNB1</i>	-0,64	-2,86	1,58	<i>PIK3C2B</i>	4,10	-0,55	6,99
<i>CTNND1</i>	1,47	-2,13	8,40	<i>PIKC3C</i>	4,21	1,31	8,40
<i>CXCL12</i>	1,47	-2,07	8,40	<i>PIK3CA</i>	5,73	0,01	9,87
<i>CXCR4</i>	4,99	1,31	7,95	<i>PIK3CB</i>	2,43	-3,46	6,87
<i>EFNB2</i>	5,34	0,86	9,47	<i>PIK3CD</i>	5,08	-0,39	9,95
<i>EGFR</i>	3,07	0,96	6,99	<i>PIK3CG</i>	7,18	1,31	10,83
<i>EPHB4</i>	-0,05	-4,32	3,58	<i>PIK3R1</i>	-0,35	-2,77	4,94
<i>ERBB2</i>	0,81	-2,71	4,31	<i>PIK3R2</i>	1,70	-0,71	5,53
<i>ERBB3</i>	2,36	-1,38	9,03	<i>PIK3R3</i>	1,60	-2,02	8,40
<i>ERBB4</i>	4,48	-2,78	11,16	<i>PIK3R4</i>	2,77	-4,23	5,85
<i>ESR1</i>	1,31	-2,61	5,62	<i>PIK3R5</i>	6,21	1,31	10,57
<i>ESR2</i>	5,26	-1,82	9,52	<i>PINK1</i>	4,59	1,31	8,40
<i>FGFR2</i>	0,70	-1,21	5,53	<i>PLK1</i>	2,52	-7,22	9,72
<i>FLT1</i>	6,03	1,31	10,19	<i>PLK2</i>	2,68	-1,89	7,34
<i>FLT4</i>	6,61	1,31	12,91	<i>PTEN</i>	1,59	-6,65	5,85
<i>FRAP1</i>	0,95	-1,22	5,53	<i>RPS6KB2</i>	2,74	0,83	7,34
<i>GPER</i>	4,34	-7,57	10,19	<i>SNAI1</i>	6,28	1,31	10,83
<i>GSK3B</i>	2,57	0,37	8,40	<i>SNAI2</i>	5,12	-3,91	10,19
<i>HIF1A</i>	1,96	-0,52	4,15	<i>SNAI3</i>	7,55	1,31	12,91
<i>ID1</i>	-0,67	-,61	7,34	<i>SPARC</i>	0,73	-3,68	3,08
<i>ID2</i>	0,79	-2,44	4,52	<i>TWIST1</i>	6,75	1,31	10,19
<i>ID3</i>	4,77	-0,38	9,95	<i>VEGFA</i>	-018	-2,88	2,60
<i>ID4</i>	0,89	-5,56	8,40	<i>VEGFB</i>	0,98	-3,41	2,89
<i>IGFR1</i>	4,26	-2,90	7,79	<i>VEGFC</i>	3,32	-4,30	8,13
<i>IL6R</i>	6,49	-2,54	10,24	<i>VHL</i>	1,96	-1,00	8,40

GEN	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	GEN	MEDIA	MÍNIMO	MÁXIMO
ILK	1,11	-2,72	5,16	ZEB1	1,34	-1,76	7,34
JUP	-1,84	-5,03	0,27	ZEB2	3,15	0,17	8,40

Tabla 3 del anexo. Análisis univariante de los genes para SLE. (NA= Not achievable)

GEN	HR	95 % LI-LS	p-valor	Boost	Lasso
AKT1	1,14	0,83 -1,56	0,42	NA	NA
AKT2	1,03	0,72 -1,48	0,84	NA	NA
AKT3	1,09	0,84 -1,42	0,48	NA	NA
AURKB	0,93	0,75 -1,15	0,55	NA	0,93
BRAF	1,12	0,78 -1,62	0,54	NA	NA
CAV1	1,08	0,71 -1,65	0,69	NA	NA
CDH1	0,90	0,68 -1,18	0,42	NA	0,70
CDH11	1,05	0,59 -1,88	0,85	NA	NA
CDH2	0,72	0,48 -1,08	0,09	0,53	0,41
CDH3	1,11	0,81 -1,51	0,49	NA	NA
CTNNA1	0,78	0,43 -1,39	0,38	NA	NA
CTNNB1	0,80	0,41 -1,52	0,50	NA	NA
CTNND1	1,18	0,93 -1,50	0,20	NA	NA
CXCL12	1,15	0,91 -1,45	0,25	NA	NA
CXCR4	0,93	0,59 -1,48	0,78	NA	NA
EFNB2	0,95	0,66-1,36	0,78	NA	NA
EGFR	1,36	0,91 -2,04	0,14	NA	NA
EPHB4	1,24	0,82 -1,89	0,28	NA	NA
ERBB2	0,95	0,61 -1,46	0,81	NA	NA
ERBB3	0,97	0,72 -1,31	0,86	NA	NA
ERBB4	0,96	0,76 -1,21	0,73	NA	NA
ESR1	1,26	0,87 -1,83	0,22	NA	1,08
ESR2	1,00	0,77 -1,30	0,98	NA	NA
FGFR2	1,30	0,90 -1,87	0,19	NA	1,13
FLT1	1,03	0,75 -1,40	0,83	NA	NA
FLT4	1,04	0,81 -1,34	0,73	NA	NA
FRAP1	1,23	0,74 - 2,04	0,43	NA	1,37
GPER	1,04	0,85 -1,27	0,67	NA	NA
GSK3B	1,01	0,65 -1,56	0,95	NA	NA
HIF1A	1,11	0,65 -1,92	0,68	NA	NA
ID1	1,18	0,95 -1,46	0,15	NA	1,05
ID2	1,03	0,60 -1,76	0,90	NA	NA
ID3	0,98	0,75 -1,28	0,90	NA	NA
ID4	1,12	0,89 -1,41	0,33	NA	NA
IGF1R	1,00	0,73 -1,37	0,99	NA	NA
IL6R	0,94	0,77 -1,15	0,57	NA	NA
ILK	1,27	0,81 -2,00	0,30	NA	NA
JUP	1,15	0,67 -1,97	0,58	NA	NA

Tabla 4 del anexo. Análisis univariante de los genes para SG. (NA= Not achievable)

GEN	HR	95 %L.I.-L.S.	p-valor	Boost
<i>AKT1</i>	1,06	0,84 -1,35	0,59	NA
<i>AKT2</i>	0,98	0,75 -1,29	0,91	NA
<i>AKT3</i>	1,05	0,86 -1,28	0,59	NA
<i>AURKB</i>	1,09	0,91 -1,30	0,32	NA
<i>BRAF</i>	0,93	0,67 -1,29	0,69	NA
<i>CAV1</i>	1,02	0,76 -1,36	0,87	NA
<i>CDH1</i>	0,94	0,78 -1,13	0,51	NA
<i>CDH11</i>	1,04	0,68 -1,60	0,83	NA
<i>CDH2</i>	0,84	0,64 -1,10	0,20	0,64
<i>CDH3</i>	1,05	0,83-1,34	0,64	NA
<i>CTNNA1</i>	0,82	0,55 -1,23	0,34	NA
<i>CTNNB1</i>	0,82	0,51 -1,31	0,42	NA
<i>CTNND1</i>	1,04	0,84 -1,28	0,69	NA
<i>CXCL12</i>	0,95	0,77-1,17	0,66	NA
<i>CXCR4</i>	1,11	0,78 -1,60	0,53	NA
<i>EFNB2</i>	0,91	0,70 -1,19	0,52	NA
<i>EGFR</i>	1,39	1,01 -1,90	0,05	1,14
<i>EPHB4</i>	1,01	0,76 -1,34	0,93	NA
<i>ERBB2</i>	1,06	0,77 -1,46	0,69	NA
<i>ERBB3</i>	1,12	0,93 -1,35	0,24	NA
<i>ERBB4</i>	1,09	0,93-1,28	0,27	NA
<i>ESR1</i>	1,18	0,89-1,57	0,24	1,69
<i>ESR2</i>	0,95	0,79 -1,14	0,62	NA
<i>FGFR2</i>	1,23	0,93 -1,63	0,17	1,05
<i>FLT1</i>	1,00	0,81 -1,24	0,94	NA
<i>FLT4</i>	0,87	0,72 -1,05	0,14	0,54
<i>FRAP1</i>	1,20	0,83 -1,72	0,33	NA
<i>GPER</i>	1,02	0,89 -1,16	0,74	NA
<i>GSK3B</i>	0,83	0,55 -1,26	0,34	NA
<i>HIF1A</i>	0,80	0,52 -1,22	0,30	NA
<i>ID1</i>	1,07	0,89 -1,27	0,45	NA
<i>ID2</i>	0,83	0,56 -1,23	0,37	NA
<i>ID3</i>	0,96	0,79 -1,16	0,71	NA
<i>ID4</i>	1,08	0,91 -1,27	0,36	NA
<i>IGF1R</i>	0,99	0,79 -1,24	0,95	NA
<i>IL6R</i>	1,02	0,87 -1,21	0,73	NA
<i>ILK</i>	1,04	0,74 -1,45	0,81	NA
<i>JUP</i>	1,22	0,82 -1,81	0,29	NA

GEN	HR	95 %L,I.-L.S.	p-valor	Boost
KDR	1,07	0,85 -1,35	0,55	NA
KIT	1,02	0,78 -1,35	0,84	NA
KRAS	1,05	0,88-1,26	0,54	NA
LYVE1	0,97	0,81 -1,17	0,79	NA
MET	0,87	0,69 -1,10	0,25	NA
NEK2	1,07	0,91 -1,27	0,37	NA
PDGFRB	1,00	0,830 -1,22	0,94	NA
PDK1	1,14	0,83 -1,57	0,39	NA
PDK2	0,96	0,73 -1,27	0,81	NA
PGR	1,03	0,85 -1,26	0,70	NA
PIK3C2A	0,89	0,60 -1,33	0,58	NA
PIK3C2B	1,01	0,76 -1,33	0,93	NA
PIK3C3	1,15	0,85 -1,55	0,36	NA
PIK3CA	0,99	0,79 -1,25	0,98	NA
PIK3CB	1,04	0,80 -1,35	0,72	NA
PIK3CD	0,99	0,80 -1,23	0,95	NA
PIK3CG	1,10	0,86 -1,39	0,41	1,16
PIK3R1	0,81	0,58 -1,12	0,18	NA
PIK3R2	1,09	0,69 -1,71	0,70	NA
PIK3R3	1,05	0,85 -1,30	0,62	NA
PIK3R4	0,97	0,77 -1,23	0,85	NA
PIK3R5	0,97	0,79 -1,20	0,81	NA
PINK1	1,10	0,83 -1,45	0,50	NA
PLK1	1,19	0,99 -1,44	0,05	1,65
PLK2	1,18	0,89 -1,55	0,24	1,24
PTEN	1,08	0,85 -1,38	0,48	NA
RPS6KB2	1,25	0,89 -1,77	0,21	1,18
SNAI1	1,03	0,81 -1,31	0,79	NA
SNAI2	0,98	0,85 -1,12	0,77	NA
SNAI3	1,04	0,89 -1,23	0,57	NA
SPARC	1,05	0,75 -1,47	0,75	NA
TWIST1	1,03	0,81 -1,31	0,79	NA
VEGFA	0,93	0,61 -1,40	0,73	0,95
VEGFB	1,20	0,80 -1,81	0,32	NA
VEGFC	1,04	0,85 -1,28	0,63	NA
VHL	0,96	0,74 -1,26	0,80	NA
ZEB1	1,03	0,80 -1,32	0,80	NA
ZEB2	0,95	0,72 -1,25	0,74	NA

GEN	HR	95 % LI-LS	p-valor	Boost	Lasso
KDR	1,08	0,80 -1,47	0,60	NA	NA
KIT	1,02	0,70 -1,48	0,91	NA	0,98
KRAS	0,97	0,77 -1,24	0,85	NA	1,10
LYVE1	0,99	0,77 -1,28	0,98	NA	NA
MET	0,92	0,67 -1,26	0,61	NA	NA
NEK2	0,93	0,77 -1,11	0,46	NA	NA
PDGFRB	1,09	0,86 -1,39	0,48	NA	NA
PKD1	1,36	0,95 -1,96	0,11	NA	1,06
PKD2	1,15	0,79 -1,68	0,44	NA	NA
PGR	1,16	0,91 -1,47	0,24	NA	1,03
PIK3C2A	0,85	0,51 -1,43	0,56	NA	NA
PIK3C2B	0,96	0,66 -1,39	0,83	NA	0,91
PIK3C3	1,43	0,99 -2,08	0,07	1,06	NA
PIK3CA	0,88	0,65 -1,20	0,45	NA	NA
PIK3CB	1,05	0,73 -1,52	0,77	NA	NA
PIK3CD	1,08	0,79 -1,47	0,60	NA	NA
PIK3CG	1,36	0,93 -1,99	0,08	1,28	1,76
PIK3R1	0,87	0,56 -1,35	0,53	NA	NA
PIK3R2	1,25	0,69 -2,27	0,46	NA	NA
PIK3R3	1,16	0,90 -1,49	0,27	NA	1,27
PIK3R4	0,95	0,70 -1,29	0,76	NA	1,07
PIK3R5	0,92	0,69 -1,23	0,60	NA	0,88
PINK1	1,20	0,82 -1,74	0,34	NA	NA
PLK1	1,08	0,85 -1,37	0,51	NA	NA
PLK2	1,47	1,05 -2,04	0,02	2,22	2,49
PTEN	1,05	0,76 -1,47	0,72	NA	NA
RPS6KB2	1,51	1,02 -2,23	0,06	1,07	NA
SNAI1	0,90	0,65 -1,23	0,52	NA	0,76
SNAI2	0,95	0,78 -1,16	0,65	NA	NA
SNAI3	1,00	0,79 -1,25	0,99	NA	NA
SPARC	0,87	0,582 -1,31	0,52	NA	1,00
TWIST1	1,10	0,78 -1,56	0,56	NA	NA
VEGFA	0,93	0,53 -1,64	0,82	NA	NA
VEGFB	1,15	0,66 -2,01	0,59	NA	NA
VEGFC	0,95	0,75 -1,19	0,67	NA	NA
VHL	1,03	0,74 -1,44	0,82	NA	NA
ZEB1	1,12	0,81 -1,53	0,49	NA	NA
ZEB2	1,00	0,69 -1,45	0,98	NA	NA

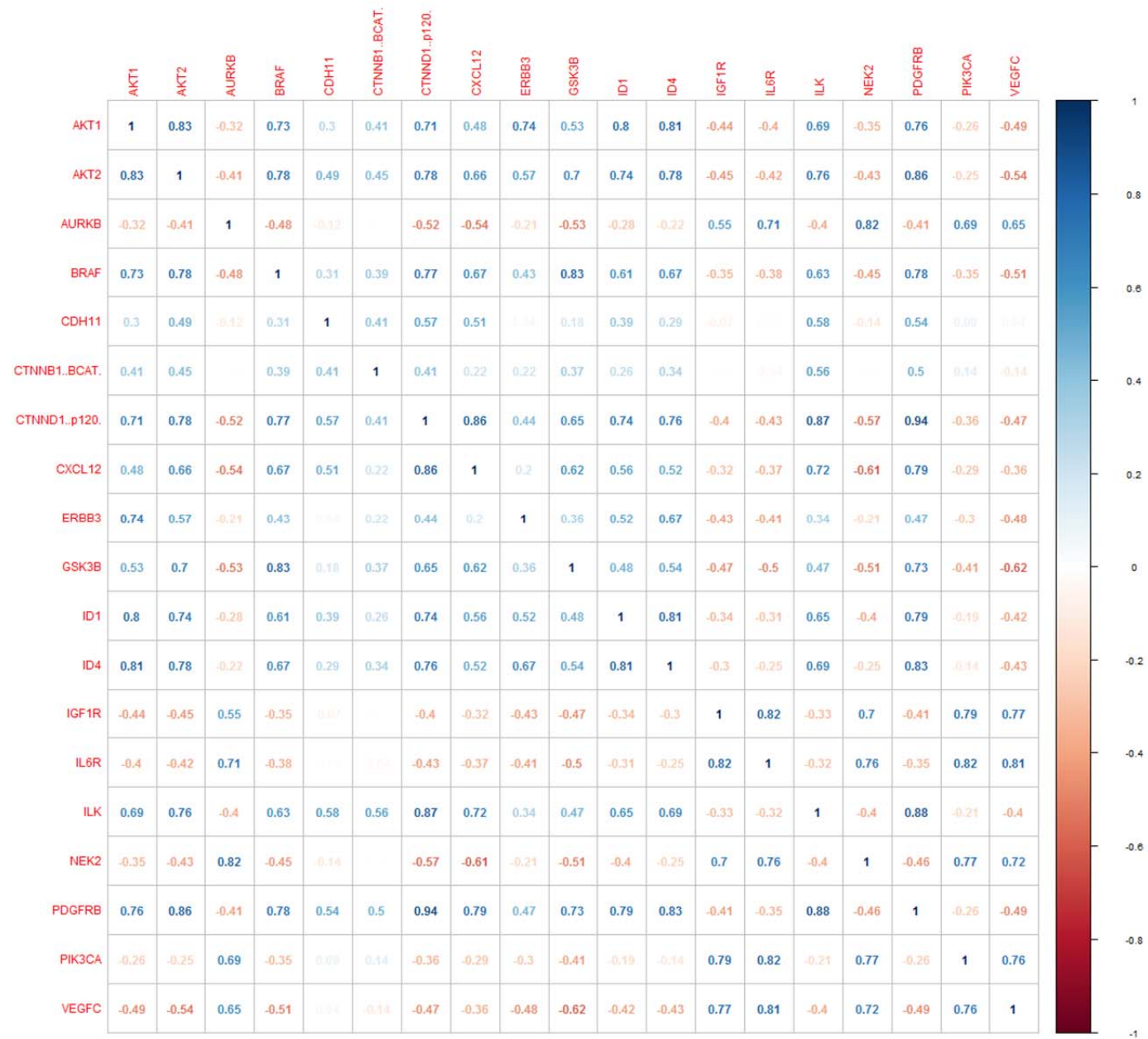


Figura 1 del anexo. Diagrama de correlación entre las distintas variables génicas